

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Georges OBOLENSKY

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR QUELQUES STIMULATIONS FONCTIONNELLES CHEZ LES PLANTES PAR LES ULTRA-SONS.

2^e THÈSE. — DIVERSES ACTIONS DES ULTRA-SONS EN BIOLOGIE.

Soutenues le 11 mars 1957, devant la Commission d'examen

MM. LUCAS..... *Président.*

CHOUARD ..	} <i>Examineurs.</i>
ULRICH	
CALVET	

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT
4, RUE DANTE, 4

—
1958

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. Georges OBOLENSKY

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR QUELQUES STIMULATIONS FONCTIONNELLES CHEZ LES PLANTES PAR LES ULTRA-SONS.

2^e THÈSE. — DIVERSES ACTIONS DES ULTRA-SONS EN BIOLOGIE.

Soutenues le 11 mars 1957, devant la Commission d'examen

MM. LUCAS..... *Président.*

CHOUARD ..

ULRICH

CALVET

} *Examineurs.*

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT

4, RUE DANTE, 4

1958



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. J. PÉRÈS.

PROFESSEURS

G. JULIA... T	Anal. sup. et Alg. sup.	TRILLAT ... T	Microsc. et diffr. électron.
E. DARMOIS .. T	Enseign. de Physique.	WIEMANN .. T	Chim. organ. structurale.
FOCH T	Mécan. phys. et Expér.	JACQUINOT . T	Spectr. et phys. céleste.
PAUTHENIER. T	Electrotech. générale.	VASSY T	Phys. de l'atmosphère.
DE BROGLIE . T	Théories physiques.	DESTOUCHES ...	Théories physiques.
PRENANT .. T	Anat. et Hist. comparées.	M. PRUVOST . T	Géologie.
GARNIER ... T	Géométrie supérieure.	AMIEL T	Chimie (P.C.B.).
PÉRÈS T	Mécan. des fluides et appl.	HOCART T	Minéralogie.
LAUGIER ... T	Physiologie générale.	J.-P. MATHIEU	Physique (P.C.B.).
M. CURIE .. T	Physique (P.C.B.).	COUTEAUX .. T	Biol. anim. (P.C.B.).
BARRABE ... T	Géol. struct. et appl.	MAY T	Biol. anim. (P.C.B.).
G. DARMOIS . T	Calc. des prob. et phys. math.	CHOQUET ... T	Calc. diff. et Intégral.
J. BOURCART. T	Géogr. phys. et Géol. dynamique	FELDMANN ...	Biologie (P.C.B.).
PLANTEFOL . T	Botanique.	GUINIER T	Physique (P.C.B.).
GRASSE ... T	Evol. des êtres organisés.	JOST T	Biologie (P.C.B.).
PRÉVOST ... T	Chimie organique.	FORTEY ... T	Calc. des probabilités.
BOULIGAND . T	Applic. de l'analyse à la Géom.	SCHWARTZ ... T	Méth. math. de la Phys.
CHAUDRON . T	Chimie appliquée.	CHOUARD ... T	Physiologie végétale.
WYART ... T	Minéralogie.	MALAVARD ... T	Aviation.
TEISSIER ... T	Zoologie.	BRELOT ... T	Calcul différentiel.
MANGENOT .. T	Biologie végétale.	NORMANT... T	Chimie (P.C.B.).
P. AUGER ... T	Phys. quantique et Relat.	BENARD T	Chimie (P.C.B.).
MONNIER ... T	Physiologie des fonctions.	BUVAT T	Botanique (E.N.S.).
PIVETEAU ... T	Géologie.	DUGUE T	Statist. mathématiques.
ROCARD T	Physique (E.N.S.).	GELOSO T	Chimie (S.P.C.N.).
H. CARTAN . T	Mathémat. (E.N.S.).	SOULAIRAC .. T	Psychophysiologie.
LAFFITTE ... T	Chimie générale.	ULRICH T	Physiologie végétale.
FAVARD ... T	Mécanique générale.	MARÉCHAL .. T	Opt. théorique et appl.
COULOMB ... T	Physique du Globe.	KIRRMANN ... T	Théories chimiques.
Mlle COUSIN . T	Biol. animale (P.C.B.).	CHADEFAUD ...	Botanique.
CHRÉTIEN ... T	Chimie minérale.	DESTRIAU ... T	Physique (M.P.C.).
P. DRACH ... T	Zoologie.	Mlle LE BRETON	Physiologie générale.
KASTLER ... T	Physique.	SALEM T	Mathématiques génér.
EPHRUSSI ... T	Génétique.	LELONG T	Mathématiques génér.
WURMSER ... T	Biol. Physico-chimique.	DEVILLERS ...	Anat. et Histol. compar.
RIVIÈRE ... T	Géologie (S.P.C.N.).	EHRESMANN . T	Topologie Algébrique.
GAUTHERET . T	Biol. végétale (P.C.B.).	FRANÇON	Physique (M.P.C.).
LUCAS T	Recherches physiques.	GLANGEAUD . T	Géogr. phys. et géol. dyn.
A. THOMAS . T	Biologie cellulaire.	GODEMENT . T	Mathémat. (M.P.C.).
ARNULF ... T	Optique appliquée.	PISOT T	Calc. des probabilités.
M. MORAND . T	Physique.	ROCH E.	Géologie.
SOLEILLET . T	Physique.	SCHATZMANN ...	Astrophysique.
FORTIER ... T	Mécan. expér. des fluides.	TERMIER ... T	Paléontol. stratigraph.
DANJON ... T	Astronomie.	ZAMANSKY ... T	Mathématiques générales.
FROMAGEOT . T	Chimie biologique.	JOLIOT T	Phys. nucl. et radio-act.
LAPORTE ... T	Phys. gén. et radio-act.	LENNUIER ...	Physique (P.C.B.).
JANET T	Méc. anal. et Méc. céleste.	RIZET T	Génétique.
PETIT T	Biologie maritime.	Mme TONNELAT	Théories physiques.
QUENEY ... T	Mét. et dyn. atmosphér.	DIXMIER	Mathémat. (M.P.C.).
GALLIEN ... T	Embryologie.	SOUCHAY	Chimie (P.C.B.).
EICHHORN . T	Biologie Vég. (P.C.B.).	AIGRAIN	Physique (P.C.B.).
DE CUGNAC ...	Biolog. Vég. (P.C.B.).	BRUSSET	Chimie (P.C.B.).
Mlle CAUCHOIS T	Chimie physique.	M. LÉVY T	Physique théorique.
THELLIER ... T	Physique du Globe.	LENORMANT ...	Physiologie.
L'HÉRITIER . T	Génétique.	Mme CHAIX ...	Chimie biologique.
GRIVET T	Radioélectricité.	Mme HUREL-PY	Biologie vég. (P.C.B.).
PONCIN T	Mécanique des fluides.	PIAUX T	Chimie (P.C.B.).
THIERY T	Mécanique appliquée.	BRUN T	Méc. expér. des fluides.
DUBREIL ... T	Arith. et théor. des nomb.	LEDERER	Chimie biologique.
QUELET T	Chimie organique.	Mme DUBREIL..	Mathématiques.
CAGNIARD ... T	Géophys. appliquée.	Mme LE LONG .	Mathém. (E.N.S.).
CHAMPETIER . T	Chimie macromolécul.	BELLAIR	Géologie (S.P.C.N.).
CUVILLIER... T	Géol. struct. et appliquée.	COTTE T	Physique (M.P.C.).
JUNG T	Pétrographie.	DUBOIS J. E..	Chimie (M.P.C.).
		LAMOTTE.	Zoologie.
		LE ROLLAND ..	Mécan. des fluides.
		MICHEL T	Chimie (P.C.B.).

Secrétaire général G. MONIER

A ma mère,

En témoignage de ma
profonde affection.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

REMERCIEMENTS

Je suis très profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur CHOUARD, de la Faculté des Sciences de Paris, d'avoir bien voulu patronner ma Thèse, d'en avoir accepté la présidence du Jury, de m'avoir constamment guidé dans mes travaux et aidé de ses conseils.

Je remercie Monsieur le Professeur E. CALVET, de la Faculté des Sciences de Marseille, qui m'a aimablement accueilli dans son Laboratoire de Microcalorimétrie, m'a fait profiter de sa longue expérience dans ce domaine, m'a prodigué ses précieux conseils, et a bien voulu accepter de faire partie de mon Jury.

Je remercie également Monsieur le Professeur GRABAR, de l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu s'intéresser à mes travaux, m'a aidé de sa profonde connaissance de l'action biologique des Ultra-sons, et a bien voulu accepter de faire partie de mon Jury.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur R. BUSNEL, Directeur du Laboratoire de Physiologie Acoustique de l'I.N.R.A., qui m'a invité à travailler dans son Laboratoire, grâce à qui je suis venu en France et qui a dirigé mes premiers pas dans la voie de cette science nouvelle et a toujours manifesté un grand intérêt à mes études.

Je suis également reconnaissant à Monsieur F. CANAC, Directeur du Centre de Recherches Scientifiques, Industrielles et Maritimes de Marseille, qui m'a autorisé à utiliser pour mes travaux sa belle installation de production des Ultra-sons et m'a aidé de ses conseils.

Je remercie Monsieur GUILBOT, Directeur du Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales de l'I.N.R.A., qui m'a accueilli dans son Laboratoire, me donnant ainsi la possibilité de poursuivre mes études enzymologiques, et m'a prodigué ses précieux conseils.

Mes remerciements vont également à la Direction du Centre National de la Recherche Scientifique à Paris pour l'aide financière dont elle a bien voulu me faire bénéficier.

J'exprime à Monsieur le Professeur L. P. V. JOHNSON, de l'Université d'Alberta (Canada), toute ma gratitude pour m'avoir engagé à aborder le sujet de ma thèse,

à Monsieur le Professeur FREY-WYSSLING, Directeur de l'Institut de Botanique de l'Ecole Technique Supérieure Fédérale de Zurich (Suisse), pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire et orienté vers mes recherches actuelles de Microscopie électronique,

et à Monsieur le Professeur Ch. OBERLING, Directeur de l'Institut du Cancer, au Collège de France, pour me donner la possibilité de poursuivre mes travaux dans cette voie.

Je remercie également mes Camarades et Amis qui, dans les divers Laboratoires où j'ai séjourné, ont bien voulu faciliter mon travail et en particulier, M. H. THIBON, de Marseille, qui m'a conseillé utilement dans la rédaction de ma Thèse.

« Enfin, je voudrais exprimer ma gratitude à Monsieur le « Professeur STAUDINGER, prix Nobel en Chimie Macromoléculaire, Fribourg, i. B., Allemagne, pour l'intérêt qu'il a bien « voulu montrer à l'exposé de mes idées. »

« Monsieur le Professeur STAUDINGER attribue, pour sa « part, les résultats présentés dans notre Thèse à la dégradation « (dépolymérisation) des macromolécules à chaînes longues. »

RECHERCHES SUR QUELQUES STIMULATIONS FONCTIONNELLES CHEZ LES PLANTES PAR LES ULTRA-SONS

par M. Georges OBOLENSKY

RÉSUMÉ

L'étude expérimentale des propriétés stimulatrices des vibrations ultra-sonores a pu montrer que des graines d'orge traitées germaient plus vite et se développaient plus rapidement que les plantules provenant des graines non traitées.

Par des mesures effectuées à l'aide du microcalorimètre CALVET, on a comparé les courbes représentant la cinétique de la thermogénèse dans le cas des graines traitées et non traitées par les ultra-sons.

Ces courbes ont montré que la durée de la thermogénèse physico-chimique est diminuée dans le cas des graines traitées et que le phénomène passe rapidement de la phase physico-chimique à la phase de thermogénèse biologique.

Les analyses enzymatiques de l' α -amylase et de la cellulase ont mis en évidence l'effet activant des traitements sur des enzymes.

L'accélération de l'activité enzymatique prouve qu'en plus d'une augmentation de la perméabilité des membranes, il vient s'y associer des actions dépolymérisantes (dépolymérisation de l'amidon par l'amy-lase).

Le traitement de la vanille verte, en gousses entières ou en « cuts », ayant donné des taux de vanilline supérieure à ceux des témoins montre, de son côté, l'effet profond excitant des ultra-sons sur divers systèmes d'un organisme vivant.

AVANT-PROPOS

Dans nos premières recherches, l'étude de l'accélération de la germination et de la maturation des céréales par les Ultra-sons a tout d'abord été motivée par la considération du court espace de temps qui, dans de vastes régions du Canada, sépare l'époque des semailles de celle de la maturité.

En vue de participer à l'effort scientifique considérable engagé pour surmonter des difficultés climatiques, nous nous sommes proposé de rechercher si certains phénomènes génétiques ou biochimiques pouvaient être accélérés par des moyens physiques et en particulier par l'action des ondes ultra-sonores.

En premier lieu, nous avons entrepris une étude générale de l'accélération de la germination, à l'aide de mesures du métabolisme effectuées en faisant appel au phosphore radio-actif (P^{32}).

Ayant au cours de ces travaux préliminaires, obtenu d'intéressants résultats, il nous a paru nécessaire de disposer pour nos mesures d'une méthode précise et rigoureuse. Elle nous a été fournie par l'analyse microcalorimétrique mise au point par MM. les Professeurs PRAT et CALVET.

Les thermogrammes obtenus avec le microcalorimètre ont montré, non seulement la réalité de l'accélération du métabolisme des graines traitées, mais en outre la production de phénomènes biochimiques à l'intérieur de ces graines, ce qui conduirait à penser que des effets enzymatiques étaient déclenchés pendant le traitement aux Ultra-sons.

Cette action enzymatique mise en évidence dans la première phase de la thermogénèse physico-chimique apparaissant sur les thermogrammes microcalorimétriques, fut confirmée par la suite à l'aide d'analyses faites sur les deux enzymes : α -amylase et cellulase, choisis à cause de leurs effets spécifiques : l'amylase transformant l'amidon (endosperme) en maltose, et la cellulase déshydrolysant la cellulose (parois cellulaires) et donnant un glucide comme produit final. Ainsi la dégradation (dépolymérisation) rapide par accroissement des actions enzymatiques, conduisait à la conclusion logique que l'embryon bénéficiait de quantités plus grandes d'éléments nutritifs dans un temps plus court, ceci produisant une accélération du métabolisme de l'embryon.

Comme suite aux résultats obtenus avec l'amylase et la cellulase, des essais furent entrepris en vue d'accroître la proportion de Vanilline dans les gousses de vanille verte, ce qui présenterait un grand intérêt commercial pour les régions productrices de cette Orchidée de Madagascar, par exemple. Des essais sur la Vanille ont apporté une confirmation très nette de l'effet enzymatique produit par le traitement.

Un examen à l'aide du microscope électronique de l'embryon et de l'endosperme est en cours, mais il est très probable que les modifications produites sont à une échelle « amicroscopique » (d'après la terminologie du Professeur FREY-WYSSLING), c'est-à-dire ne peuvent être observés avec les moyens actuels de la microscopie électronique. Peut-être, dans l'avenir, les perfectionnements apportés à la microscopie électronique ou à l'emploi de la micros-

copie par rayons X, permettront-ils d'accéder à ces nouveaux domaines.

En somme, nous avons pu, à l'aide de méthodes qui seront décrites au cours de notre Thèse, montrer la possibilité par des traitements aux Ultra-sons, non seulement d'améliorer le régime agricole des régions nordiques (germination et maturation plus rapides), ou des régions arides (acceptation et pénétration d'eau dans les graines), mais encore de valoriser certains produits tropicaux (Vanille) et de rendre des services dans le domaine industriel (l'effet biochimique-enzymatique sur l'amylase et la cellulase étant d'une importance primordiale en brasserie).

INTRODUCTION

1^o RAPPEL DE GÉNÉRALITÉS SUR LES ULTRA-SONS :

Les Ultra-sons sont des vibrations mécaniques à haute fréquence, dépassant la limite d'audibilité humaine comprise entre 16 et 2000 périodes par seconde.

La Fréquence est le nombre de périodes par seconde et la Période du mouvement vibratoire considéré représente l'intervalle de temps qui s'écoule entre deux passages d'une particule par la même position et dans le même sens.

Les Ultra-sons sont produits par transformation des courants alternatifs de haute fréquence. Ce problème de transformation fut résolu par LANGEVIN [71], grâce au phénomène de *piézo-électricité*. Ultérieurement, un autre phénomène, la magnétostriction, fut utilisé pour réaliser le transformateur électro-acoustique.

Remarque : Pour tous détails sur les Ultra-sons, voir l'ouvrage du Professeur BERGMANN [9], ainsi que les publications traitant des Ultra-sons dans le domaine de la Physique.

Application des Ultra-sons :

Ce n'est qu'en 1927, lorsque WOOD et LOOMIS [126] firent au Congrès International des Physiciens à Como leurs premières communications sur les ondes ultra-sonores intenses, que prit réellement naissance cette nouvelle science. En ce qui concerne la biologie, c'est grâce aux remarquables travaux du Professeur DÖGNON et du Dr BIANCANI, en 1937 [40] (Ultra-sons en biologie),

qu'apparurent les possibilités d'application des Ultra-sons dans ce domaine. Cependant, le mécanisme de l'action activante des Ultra-sons n'est pas encore entièrement élucidé, malgré les recherches entreprises depuis de nombreuses années.

Pour essayer de l'expliquer, il convient de distinguer trois facteurs susceptibles d'agir : un facteur thermique, un facteur mécanique et un facteur chimique.

L'action de tels facteurs présente donc un intérêt pour les applications biologiques et particulièrement pour certains problèmes agricoles et industriels.

Actuellement, des tendances contradictoires affectent les travaux relatifs à ce domaine : pour les uns, les Ultra-sons accélèrent la germination, la croissance et les rendements ; pour d'autres, ils exercent une action de retardement et une action létale. Du reste, le même désaccord se manifeste au sujet de leur action en biologie animale et en pathologie humaine, certains médecins obtenant des guérisons et d'autres des aggravations d'état.

Aussi, y avait-il intérêt à essayer de préciser la cause de ces divergences ; nous l'avons fait en nous plaçant dans un domaine de la biologie végétale qui nous est familier et avons entrepris l'étude de l'action des Ultra-sons sur la germination des grains d'orge et la croissance des plantules qui en sont issues.

En premier lieu, nous avons suivi l'effet du traitement ultrasonore à l'aide des critères que nous appellerons classiques : mesure du pouvoir absorbant des graines pour l'eau, indices de V. DURANT (1953), observation de la vitesse de croissance des plantules etc. en examinant particulièrement l'influence de la longueur d'onde.

Nous avons ensuite fait appel, pour caractériser et mesurer l'accélération des processus métaboliques, aux nouvelles techniques microcalorimétriques mises au point par M. le Professeur CALVET de la Faculté des Sciences de Marseille.

Nous avons pu étudier ainsi la thermogénèse de la germination et y distinguer divers stades.

Dans un troisième chapitre, nous avons abordé l'étude de l'action des Ultra-sons sur l'activité enzymatique. Cette étude était la suite logique des essais précédents au cours desquels on avait observé que l'accélération de la germination se manifestait encore plusieurs semaines ou plusieurs mois après le traitement des graines, ce qui tendait à prouver que ces dernières avaient subi, pendant ce traitement, de profondes modifications biologiques.

Nous avons été ainsi naturellement conduit à envisager la possibilité d'une activation durable d'un enzyme agissant sur les réserves nutritives des graines, par exemple l'alpha-amylase.

Enfin, les résultats favorables obtenus dans l'étude de l'action des Ultra-sons sur l'activité enzymatique, nous ont amené à entreprendre le même travail sur la vanille en vue, non seulement de poursuivre nos recherches théoriques ayant pour objet l'étude approfondie du mécanisme du phénomène, mais encore d'en examiner accessoirement les possibilités d'applications pratiques.

Comme les essais que nous avons effectués dans chaque partie de notre travail étaient suffisamment nombreux, nous avons fréquemment eu recours, pour leur interprétation, à l'analyse statistique.

2° RAPPEL DES PRINCIPAUX TRAVAUX, TENDANCES ET PROBLÈMES ENVISAGÉS :

Etant donnée l'importance de la littérature concernant l'action des Ultra-sons dans divers domaines, ces travaux seront présentés dans la deuxième Thèse.

Toutefois, comme il n'existe que peu de travaux d'ensemble sur l'action des Ultra-sons sur la germination et la croissance des végétaux supérieurs divers, nous donnerons, ci-dessous, un bref aperçu des tendances et des résultats obtenus dans ce domaine.

En biologie, les premières recherches ont été effectuées sur des bactéries et en thérapeutique humaine. Ce n'est qu'au cours des dernières années, qu'on a commencé à s'intéresser à l'action des Ultra-sons dans le triple domaine agricole, industriel et phytopathologique.

Deux tendances extrêmes — stimulation de croissance et retardement de celle-ci — sont généralement attribuées à l'action des ondes Ultra-sonores, et dépendent de la durée et de l'intensité de l'irradiation.

Malgré de nombreuses études de l'effet biologique des vibrations ultrasonores sur les cellules de plantes et d'animaux, il n'y a pas unanimité chez les chercheurs pour expliquer le mécanisme d'action ou l'efficacité des vibrations ultra-sonores à produire des changements génétiques.

WALLACE et al. (1948), BUSHNELL et WALLACE (1948), DUBOW (1949), considèrent que les changements génétiques provoqués par les Ultra-sons sur les plantes et sur la *Drosophila*, *ne sont pas dus à des cavitations intercellulaires*, mais à des vibrations mécaniques, suivies de changements chimiques secondaires et à un mélange partiel du contenu protoplasmique (voir NEWCOMER et al., 1949).

Les recherches effectuées par SPENCER (1952) dans ses travaux concernant *l'effet de l'énergie ultrasonore sur les cellules des*

bouts de racines de petits pois, prouvent, comme l'ont montré d'autres chercheurs, que les Ultra-sons produisent des altérations nucléaires, des ruptures de chromosomes et de chromatines, une vacuolisation des noyaux, ainsi que des nécroses assez fortes.

D'après LOZA (1949), l'effet des Ultra-sons est proportionnel à l'épaisseur du tissu. Ceci pourrait expliquer pourquoi SPENCER trouve que les régions centrales du méristème, les extrémités des racines sont affectées en dernier lieu. SPENCER attribue cet effet à une plus grande densité du cytoplasme des cellules se trouvant en position isodiamétrique du méristème et qui fournissent une matrice plus rigide au noyau et aux chromosomes.

Il apparaît que les régions les plus sensibles à l'irradiation ultra-sonore sont celles des tissus composés de cellules ayant un très haut degré de vacuolisation et celles des parois primaires très minces. Les grandes vacuoles présentes dans ces cellules sont probablement la cause des altérations profondes apportées à ces tissus, ainsi que la perte de chromatine, l'effondrement des parois cellulaires et la nécrose.

D'après HARVEY et LOOMIS (1928), une force beaucoup plus grande est nécessaire pour produire des cavitations dans les liquides lourds, visqueux, e. g. cytoplasme, que dans le liquide plus léger des vacuoles. Ceci pouvant s'expliquer par le fait que les liquides visqueux ont une pression cohésive plus élevée. SIEGENAGE cité par SPENCER, trouve que la vacuolisation dans le cytoplasme n'est pas nécessairement un facteur de division anormale des noyaux, mais qu'une altération de la force régulatrice de la viscosité des cellules peut permettre à d'autres facteurs d'influencer la division cellulaire. FRENZEL et al. (1935) ont démontré que *l'énergie ultra-sonore augmentait et accélérât la diffusion par des membranes*, et que les effets de la radiation Ultra-sonore sur du matériel vivant dépendent, pour une même durée, de l'intensité de l'irradiation.

Dans le cas où la puissance dépasse une certaine limite, il se produit, d'après STUMPF et al., une dénaturation et une inactivation des protéines liées.

En outre, on constate que certains types de cellules sont facilement désintégrés, tandis que d'autres restent réfractaires.

D'autre part, le fait qu'il se produit des modifications très prononcées des cellules de racine de petits pois telles que perte de chromatine, rupture de chromosome, vacuolisation des noyaux etc. *peut être attribué à des changements fondamentaux du système physico-chimique des cellules.*

Ayant constaté qu'un accroissement considérable de longueur (en comparaison des contrôles) se manifestait dans les

racines traitées de petits pois, SPENCER (1952) poursuivit ses travaux sur l'étude de l'effet des Ultra-sons sur la *croissance* et l'*hérédité*.

Une stimulation de croissance, une maturité plus précoce, un accroissement de rendement et des variations cytogénétiques furent attribués par divers chercheurs à l'action des Ultra-sons. D'autres recherches montrent des effets d'inhibition et de lésions.

ISTOMINA et OSTROWSKY (1936) observèrent une maturité précoce et un accroissement du rendement chez les petits pois et les pommes de terre, traités aux Ultra-sons, ainsi que des effets enzymatiques positifs. Ils trouvèrent qu'une irradiation des grains de semences de pomme de terre « Alma » (trait. 25 sec., 50 sec., 1 min.) donnait une augmentation du poids des tubercules de 25 à 45 %. Cette augmentation est d'autant plus étonnante que le poids des feuilles de ces plantes était de 33% inférieur à celui des témoins. N'ayant pu se produire que par photosynthèse, elle est difficile à expliquer du point de vue physiologique. Dans d'autres expériences, des petits pois dont les grains étaient traités de 1 à 5 minutes montrèrent, pour les traitements les plus intensifs, une augmentation du poids de la masse végétative de 241 % par rapport à celle des témoins ; après des traitements plus faibles, l'augmentation était moins grande.

Au cours de nos travaux au Canada sur l'hybridation et la production de pollen de diverses lignées de tournesols, nous avons pris contact avec le Dr WALLACE de l'Université de Connecticut, U.S.A., qui avait obtenu une floraison de 4 à 6 semaines plus avancée sur des plantules de tournesol traitées aux Ultra-sons. En effet, la réalisation d'une floraison et d'une maturation plus précoces est de première importance dans les régions où les périodes de développement et de maturation des plantes sont étroitement limitées par certains facteurs, dont notamment le froid.

Le Dr WALLACE ayant obtenu des grains après avoir greffé des albinos sur des tigelles vertes (provenant du traitement de plantules de tournesol aux Ultra-sons) nous expédia des semences (F_1 et F_2) pour essai de culture dans le Nord du Continent Américain (Canada).

Certaines de ces lignées ne germèrent pas. La plupart des autres produisirent des albinos dans une proportion de 3 à 1 (proportion de ségrégation intéressante du point de vue génétique) dont presque toutes succombèrent par manque de chlorophylle. Celles des pousses ayant un peu de chlorophylle devinrent vert-jaune et rattrapèrent les pousses vertes. En outre, plusieurs mutations apparurent sous forme de plantes naines.

Durant une saison de végétation très courte (53° de latitude),

les plantes se développèrent normalement, mais les semences ne mûrirent pas, en raison du froid sévère.

Comme les tiges de ces tournesols atteignirent une hauteur de 14 pieds (celles de ces régions n'ayant normalement que 6 à 8 pieds), nous entreprîmes l'analyse de la *cellulose* (α , β , γ) contenue dans ces tiges, en vue de la fabrication du papier. Les tiges séchées pendant deux semaines dans le champ par le froid, donnèrent un rendement de 6,8 tonnes par acre (40 ares), et l'analyse de l' α -cellulose (celle intéressant la fabrication du papier), montra une production moyenne de 2,3 tonnes. En outre, des expériences avec des variétés courantes pour cette région furent entreprises et aboutirent à un accroissement du diamètre des têtes de tournesols (1).

Etant donné que dans les grains de tournesols il se trouve, dans la plupart des cas, une couche d'air intermédiaire entre les parois extérieures des grains et de l'embryon et que cette couche aurait pu réfléchir les Ultra-sons, une autre série de traitements fut entreprise, après élimination de cette couche extérieure.

Les résultats obtenus s'avérèrent très analogues. Ceci nous oriente vers des conclusions qui seront présentées dans le chapitre de notre thèse, relatif à l'activité enzymatique.

De plus, des traitements de Pommes de terre, Maïs, Avoine, Blé et Orge furent effectués et donnèrent des indications intéressantes. N'ayant pas le temps et la possibilité de poursuivre ces diverses recherches simultanément, nous nous sommes limités à l'Orge, étant donné l'intérêt économique de cette céréale pour le Nord du Canada.

En effet, comme la maturation de l'Orge est plus rapide que celle du Blé, ceci présente un intérêt primordial pour ces régions. En outre, le pourcentage de protéines décroît dans les régions du Nord, ce qui constitue un facteur *positif pour l'Orge* (brasserie) et *négatif pour les Blés*, car le marché mondial exige une teneur assez élevée en protéines pour les Blés Canadiens.

Les résultats des recherches poursuivies en France et exposés dans cette Thèse, incitent à penser que les travaux dans ce domaine ouvriront de nouveaux horizons. Aussi, nous nous permettons de suggérer que les futures recherches concernant l'action des Ultra-sons en biologie, soient basées sur des études au microscope-électronique, sur des analyses biochimiques-enzymatiques, sur des travaux génétiques, microcalorimétriques, ainsi que sur ceux relatifs aux hormones, l'ensemble de ces études permettant de mieux pénétrer le mécanisme de l'action de ces irradiations.

(1) Voir OBOLENSKY, Radio-Electronics, New-York, July 1953, p. 76 80.

L'aperçu donné ci-dessus ne montre que très brièvement l'importance de la contribution que les diverses applications des Ultra-sons apporteront à la Science, en ouvrant la voie à des domaines inconnus et nouveaux.

CHAPITRE I

Étude de l'accélération de la germination de l'orge par les ultra-sons.

A) OBJET ET PLAN DE L'ÉTUDE

Dans ce chapitre, nous exposerons en premier lieu nos recherches relatives à la mise en évidence de l'action des ultra-sons sur les graines. Pour définir quantitativement l'importance de cette action, nous ferons appel à quatre essais distincts qui seront effectués comparativement sur les lots de graines traitées et sur des lots témoins. Ces essais sont les suivants :

- a) Mesure de l'aptitude des graines à absorber l'eau ;
- b) Mesure de l'accélération de la germination des graines à l'aide des indices de V. DURAND (1953) ;
- c) Mesure de l'accélération de la croissance et du métabolisme des plantules issues de ces graines et cela, soit par détermination de leur teneur en H_2O , soit en utilisant le phosphore radioactif P_{32} (Méthode de E. Roux et E. Tytzkiewicz de la Station Agronomique de Versailles).

En deuxième lieu, nous préciserons l'influence de la longueur d'onde des ultra-sons sur leur action germinative. A cet effet, nous ferons varier la longueur d'onde de 23 à 960 KHz en maintenant constantes la puissance ultra-sonore ainsi que la durée du traitement et en utilisant toujours, pour le contrôle des effets produits, les critères que nous venons de définir.

B) MATÉRIEL ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

I. ECHANTILLONNAGE DE GRAINES UTILISÉES :

Nous avons utilisé des échantillons d'Orge sélectionnés de Vilmorin, Variétés Rika et Fraja (précoce), mis aimablement à notre disposition par Monsieur MAYER, Chef de Section de Génétique de l'I.N.R.A., à Versailles.

Nous avons choisi l'Orge pour plusieurs raisons :

a) l'obtention d'une maturation plus précoce de cette céréale présente pour les régions du Nord du continent américain (Canada) une importance considérable ;

b) l'Orge est susceptible d'application industrielle (brasserie) ;

c) nous avons ainsi la possibilité de comparer nos résultats à ceux déjà obtenus au Canada.

II. DISPOSITIF UTILISÉ POUR TRAITER LES GRAINES PAR LES ULTRA-SONS :

Le traitement était effectué dans des cuves à eau des générateurs à quartz (Société de Condensation et d'Application Mécaniques, S.C.A.M., Paris) ou à magnétostriction sous des fréquences contrôlées de 23, 240, 412 et 950 KHz, avec des puissances acoustiques de 1 à 6 watts/cm² pendant des temps de 5 à 20 minutes.

Les graines étaient immergées dans un courant d'eau circulant à travers un manchon perforé, en plexiglas, qui les maintenait dans l'axe du faisceau ultra-sonore au-dessus du cristal vibrant ou de la surface émettrice.

Le courant d'eau agitait les graines de façon à les faire passer régulièrement dans le faisceau ultra-sonore ; en outre, ce procédé permettait de maintenir l'eau à une température constante de 16 à 17° C.

Le diamètre du quartz utilisé était de 6 cm et la surface du magnétostricteur de 60 cm².

III. CONTROLE DE L'EFFET DU TRAITEMENT SUR LES GRAINES :

1° *Aptitude des graines à absorber de l'eau :*

Pour déterminer la quantité d'eau absorbée, les graines ont été pesées avant et après le traitement aux ultra-sons ; elles étaient essorées sur papier-filtre et séchées à l'étuve jusqu'à un poids constant. Les plantules provenant des graines traitées et non-traitées furent séchées de la même manière, jusqu'à poids constant.

Ayant ainsi déterminé la teneur en eau des graines avant et après le traitement aux ultra-sons, on a pu constater que la quantité d'eau absorbée par la graine était d'environ 15% plus grande en présence d'ultra-sons (ces valeurs étant variables dans les limites de temps et de puissance indiquées plus haut). En outre, des traitements dans une eau colorée avec du bleu de méthylène à 5‰ furent entrepris pour étudier la quantité absorbée, ainsi que la profondeur de pénétration du colorant. Ces traitements étaient effectués dans un courant continu du liquide coloré entretenu dans la cuve aux ultra-sons à l'aide d'une pompe aspirante et foulante. Pour obtenir un maximum de coloration du liquide extracteur, les graines ont été, après le traitement, desséchées puis *broyées* (une mouture provoquant une perte de colorant) et l'extraction à l'alcool absolu a été effectuée par agitation suivie d'un temps de repos pour permettre au solvant d'enlever le maximum de colorant absorbé.

Les intensités de coloration obtenues, représentant ainsi la capacité d'absorption des graines, ont été ensuite mesurées avec un photolorimètre à cellule.

Des études microscopiques sur des coupes faites au microtome à congélation et provenant des graines colorées lors du traitement ont permis de mesurer la pénétration du colorant dans les tissus et ont confirmé les données obtenues par la méthode d'extraction.

2° Contrôle de la croissance des plantules issues des graines traitées et non-traitées.

Les graines ont été, après le traitement, mises à germer dans une chambre à température et hygrométrie constantes; elles reposaient sur des baguettes de verre disposées au-dessus d'une cuve à eau, le niveau de l'eau étant à 0,5 cm des graines, ce qui permettait à l'eau de monter par capillarité.

On a également utilisé des boîtes de Pétri garnies de billes de verre.

Ces procédés expérimentaux permettaient de prélever les plantules isolément et sans perte de substance végétale. Les cuves, d'une surface de 300 à 800 cm², étaient garnies de petits lots de graines, les graines traitées et les témoins étant alternés comme dans une expérience sur parcelles, ce qui rendait possible une analyse statistique des résultats obtenus. Si, après le traitement aux ultra-sons, on desséchait les graines pour les ramener à leur teneur en eau initiale et qu'on ne les remettait en germination que plusieurs semaines ou plusieurs mois après, on constatait que les augmentations observées relatives à la faculté germinative et

à l'accélération des temps moyens de germination étaient conservées.

Ce phénomène, qui se reproduit dans les expériences microcalorimétriques et biochimiques, démontre la permanence de l'effet de l'ultrasonation.

Pour mieux caractériser les différentes phases de la germination et de la croissance des plantules traitées et non-traitées aux ultra-sons, divers indices ont été utilisés, en particulier ceux qui ont été préconisés par V. DURAND, soit :

1. Le taux quotidien de germination.
2. Le temps moyen de germination (TmG.).
3. La faculté germinative (F.G.).

Le temps moyen est déduit du taux quotidien par application de la formule :

$$T = \frac{1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 2 \times n_3 \dots}{n_1 + n_2 + n_3 \dots}$$

(n_1, n_2, n_3 etc... étant les taux quotidiens obtenus les 1^{er}, 2^e, 3^e jours, etc.).

Dans ces essais, toutes les mesures ont commencé 48 heures après le traitement et ont été poursuivies pendant quatre jours. Étant donné que, dans chaque cas, des lots témoins ont été soumis exactement aux mêmes conditions que les lots traités aux ultra-sons et que chaque expérience était répétée plusieurs fois, le sens des résultats obtenus fut dégagé par différentes analyses statistiques comprenant :

1. L'analyse de variances.
2. Le test « T ».
3. Le test « Khi carré » (chi-square test of goodness of fit).
4. L'analyse d'homogénéité des variances par a) Test F.
b) Test Barlett.

3^o Etude à l'aide de P_{32} de l'accélération de la croissance et du métabolisme.

Rappelons que les isotopes sont des éléments de même numéro atomique mais de masses atomiques différentes. Ils possèdent les mêmes propriétés chimiques, mais diffèrent par la constitution de leur noyau.

En particulier, le phosphore comporte 4 isotopes de nombres de masse respectivement égaux à 29, 30, 31 et 32. Les isotopes P_{29} et P_{30} sont radioactifs et émettent des positons, l'isotope P_{32} est également radioactif et émet des négatons, P_{31} est le phosphore naturel non radioactif ; P_{32} , dont la période est de 14,3 jours, a été l'un des tout premiers éléments radioactifs artificiels employés en biologie.

Des plantules provenant de graines d'orge traitées ou non-traitées aux Ultra-sons, cultivées sur billes de verre et eau, dans une chambre à température et hygrométrie constantes, recevaient au 4^e ou 5^e jour une solution nutritive contenant 0,1 mc de P_{32} sous forme de H_3PO_4 ; on les laissait se développer sur cette solution pendant 24, 48 et 72 heures. Ensuite, après des lavages soignés à l'eau courante pour éloigner toute trace superficielle de la culture radioactive, les plantules ont été préalablement desséchées dans une étuve et ensuite réduites en cendre blanche au four électrique à 600° C.

Les mesures de radioactivité ont été faites au compteur Geiger-Muller sur les cendres pendant 2 minutes, en utilisant un filtre de cuivre N° 200.

L'adoption d'une durée de 2 minutes est une mesure de précaution pour obtenir des valeurs plus précises des coups/min.

Les valeurs fournies par ces analyses représentent la quantité de P_{32} absorbée par les plantules pendant leur séjour au contact de la solution nutritive et reflètent au moins un accroissement de la perméabilité cellulaire sans préjuger d'un accroissement du métabolisme qui peut en résulter.

C) RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. ABSORPTION D'EAU ET DE COLORANT PAR LES GRAINES :

1° *Quantité d'eau absorbée par les graines.*

Comme nous l'avons indiqué, des graines traitées aux ultra-sons, et non-traitées, ont été pesées avant et après le traitement.

Les résultats suivants ont été obtenus :

1^{re} SÉRIE D'EXPÉRIENCES

Frqu. 23 kHz, 1 W/cm² ; 200 graines orge « Rika ».

Traitement : 5 minutes.

	Poids en grammes		H ₂ O absorbé	%
	avant tr.	après tr.		
Traité	8.674	9.568	0.894	10.30
Témoin	8.720	9.602	0.882	10.10
Traitement : 10 minutes.				
Traité	8.810	9.776	0.966	11.00
Témoin	8.600	9.473	0.873	10.12
Traitement : 15 minutes.				
Traité	8.516	9.498	0.982	11.50
Témoin	8.630	9.496	0.866	10.10

2^e SÉRIE D'EXPÉRIENCES :

Frqu. 412 kHz, 3 W/cm² ; 200 graines, orge « Rika ».

Traitement : 5 minutes.

Traité	8.562	9.395	0.833	9.75
Témoin	8.635	9.401	0.766	8.90

Traitement : 15 minutes.

Traité	8.680	9.605	0.925	10.70
Témoin	8.433	9.382	0.849	10.15

Frqu. 960 kHz, 5 W/cm² ; 200 graines.

Traitement : 5 minutes.

Traité	8.550	9.497	0.947	11.10
Témoin	8.688	9.491	0.803	9.25

Traitement : 15 minutes.

Traité	8.536	9.596	1.060	12.35
Témoin	8.560	9.360	0.795	9.35

3^e SÉRIE D'EXPÉRIENCES :

Frqu. 960 kHz, puiss. max., 200 graines.

Traitement : 5 minutes.

	Poids en grammes		H ₂ O	%
	avant tr.	après tr.	absorbé	absorption
Traité	8.531	9.335	0.804	9.55
Témoin	8.422	9.170	0.748	8.95

Traitement : 15 minutes.

Traité	8.596	9.550	0.954	11.10
Témoin	8.543	9.326	0.783	9.17

Frqu. 412 kHz, puiss. max., 200 graines.

Traitement : 15 minutes.

Traité	8.565	9.408	0.943	11.00
Témoin	8.530	9.332	0.802	9.52

Traitement - 5 minutes.

Traité	8.751	9.589	0.838	9.70
Témoin	8.524	9.335	0.811	9.55

Frqu. 23 kHz, puiss max., 200 graines.

Traitement : 5 minutes.

Traité	8.424	9.310	0.886	10.55
Témoin	8.544	9.397	0.853	9.98

Traitement : 15 minutes.

Traité	8.678	9.740	1.062	12.20
Témoin	8.709	9.648	0.939	10.80

2^e Absorption de colorant par les graines.

En effectuant le traitement aux ultra-sons dans de l'eau additionnée de 5 ‰ de bleu de méthylène, on a confirmé les résultats fournis par la pesée directe de l'eau retenue.

Le colorant absorbé par les graines lors du traitement a été extrait par l'alcool absolu, comme indiqué, et dosé avec un photocolorimètre à cellule. Après des essais avec des filtres jaune et orange, nous avons remarqué que les mesures de densité optique, avec un filtre rouge, donnaient de meilleurs résultats.

Exemple : Frqu. 960 KHz, 5 W/cm² ; orge « Fréja ». Mesure des valeurs de la densité optique des filtrats d'extraits alcooliques des graines traitées dans une solution de bleu de méthylène.

Temps de trait. en min.	Densité optique en m.A.	
	Témoins	Traitées
5	0.10	0.18
10	0.175	0.225
15	0.21	0.26
20	0.22	0.29

II. DÉTERMINATION DE L'ACCÉLÉRATION DE LA GERMINATION A L'AIDE DES INDICES DE V. DURAND :

Les graines étant placées dans une chambre à température et état hygrométrique constants, on a exprimé la vitesse de germination et de croissance des plantules, à l'aide des trois indices préconisés par V. DURAND (1953) :

- Le taux quotidien de germination.
- Le temps moyen de germination (TmG).
- La faculté germinative (F.G.).

a) *Déterminations faites immédiatement après le traitement aux Ultra-sons.*

ESSAI 1. — Frqu. 23 kHz - 1 W/cm² (résultat sur 10 lots) :

Témoin		Temps de traitement	Traité	
F.G.	TmG.		F.G.	TmG.
84	1.52	10 min.	94	1.51
80	1.63	15 »	90	1.31

ESSAI 2. — Frqu. 412 kHz - 2 W/cm².

88	1.37	10 min.	96	1.37
90	1.08	15 »	93	1.05

ESSAI 3. — Frqu. 960 kHz - 2,5 W/cm².

74	2.62	5 min.	98	2.59
98	2.78	10 »	99	2.40
84	3.02	15 »	97	2.52

b) *Déterminations faites plusieurs semaines ou plusieurs mois après le traitement.*

α) 3 semaines après le traitement à 960 kHz.

Temps d'exposition	Faculté germinative											
	5 minutes				10 minutes				15 minutes			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Trait. U-S	60	97,5	98,3	98,8	51,2	92,5	93,8	96,3	61,2	93,7	97,5	97,5
Témoin	20	75	83,7	83,7	15	60	65	72,5	34,5	88,7	90	90

β) 2 mois après le traitement.

Exemple : 412 kHz, 15 minutes (F.G. et TmG).

F.G.		TmG.	
témoin	traité	témoin	traité
85	94	1,57	1,16
81	87	1,85	1,27
77,5	89	1,87	1,30

γ) 3 mois 1/2 après le même traitement.

F.G.		TmG	
témoin	traité	témoin	traité
80	94	1,54	1,37
81	94	1,66	1,56

Remarque : Toutes les données expérimentales furent analysées statistiquement à l'aide d'une analyse de variance, spéciale, permettant un calcul avec des facteurs superposés. En plus, certains résultats de nos expériences étant présentés en pourcentage inférieur à 20%, les données furent transformées trigonométriquement en : $\text{angle} = \text{arc sin. } \sqrt{\%}$. Toutes ces analyses ont prouvé l'effet positif des ultra-sons.

III. ETUDE COMPARATIVE DES PLANTULES ISSUES DE GRAINES TRAITÉES ET NON-TRAITÉES.

1° Détermination de la teneur en eau des plantules.

a) Poids frais :

Des lots de graines traitées et témoins, mis à germer, ont été examinés le 10^e jour, et le poids frais des plantules provenant de ces graines déterminé :

Exemple : 960 kHz - 2,6 W/cm² - 100 plantules.

Temps de traitement en minutes	Poids en grammes	
	Témoins	Traités
5	23,552	24,868
10	24,421	26,315
15	23,375	23,875

b) Poids sec et teneur en eau :

Sur 50 plantules provenant d'une répétition de l'expérience décrite sous a) on a déterminé le poids sec et calculé la teneur en eau :

Temps de traitement en minutes	Témoins			Traités		
	Poids frais	Poids sec	Teneur en H ₂ O	Poids frais	Poids sec	Teneur en eau
5	10,573	1,602	8,971	11,480	1,700	9,780
10	11,989	1,527	10,462	12,149	1,519	11,370
15	12,099	1,521	10,578	12,900	1,513	11,387

Le calcul du coefficient de corrélation sur l'augmentation de la teneur en eau par rapport au poids sec et le traitement ultra-sonore nous a conduit à :

$$r = 1^{**}$$

ce qui démontre que l'augmentation du poids est liée au traitement.

2° Déterminations basées sur l'utilisation du P_{32} .

Les essais précédents ont tous mis en évidence une activation réelle de la germination et de l'augmentation du poids des graines, ainsi que des plantules, après un traitement aux Ultra-sons. Comme l'étude du métabolisme des plantules pendant la croissance présente un intérêt primordial, j'ai effectué des essais de vérification à l'aide du phosphore radioactif P_{32} , suivant la technique précédemment décrite. Les résultats obtenus sont les suivants :

Exemple 1. — Frqu. 960 kHz - 6 W/cm² - 15 min. - 50 graines, mesurées au 8^e jour après le traitement. Les valeurs sont données en coups/minute. La solution radioactive fut ajoutée le 5^e jour et les plantules laissées se développer jusqu'au 8^e jour, date à laquelle les analyses ont été faites (4 répétitions).

<i>Témoins</i>	<i>Traités</i>
5,585	8,280
4,405	8,200
4,130	8,060
4,535	7,605

En outre, dans le dernier essai, chaque organe des plantules a été examiné séparément :

Radicelles	2,545	4,920
Graines	1,520	2,045
Tigelles	0,470	0,640

Exemple 2. — Frqu. 412 kHz - 5 W/cm² - 15 min. - 50 graines.

Mise en germination 3 mois 1/2 après traitement.

Solution radioactive mise en contact le 4^e jour pendant 24 heures. Prélèvement le 5^e jour. Orge « Fréja ».

	Poids frais des plantules g	Poids secs g	Poids des cendres g	Radio- activité c/m
<i>Témoins</i>	7,076	1,746	0,040	2,755
	6,711	1,786	0,042	3,085
	6,335	1,835	0,050	3,150
	6,221	1,756	0,040	3,060
<i>Traités</i>	7,188	2,072	0,110	4,300
	6,798	2,043	0,100	3,915
	6,824	2,035	0,080	4,725
	7,360	2,068	0,095	4,975

Ces expériences démontrent que des plantules provenant des grains traités ont des teneurs en matière sèche et en cendres plus élevées que les plantules témoins.

D) INFLUENCE DE LA LONGUEUR D'ONDE DANS L'ACTION DES ULTRA-SONS SUR LA GERMINATION DES GRAINES DE CÉRÉALES.

Au cours des expériences concernant l'action stimulatrice des ondes ultrasonores sur la germination et la croissance, nous avons constaté qu'à égalité de puissance ultrasonore et de durée de traitement, la longueur d'onde, dans les limites entre 23 kHz et 1 MHz, n'influe pas sur les résultats obtenus.

Nous avons effectué des essais systématiques de vérification en utilisant les procédés de contrôle de l'action germinative décrits précédemment, auxquels nous avons joint quelques mesures microcalorimétriques des chaleurs dégagées par la germination, cette technique devant d'ailleurs faire l'objet d'un chapitre spécial.

Les résultats suivants ont été obtenus :

1. *Quantité d'eau absorbée par les graines d'orge ultra-sonnées en fonction de la fréquence, pour une puissance moyenne de 3 W/cm² (sur 200 graines d'orge) :*

Temps de traitement en minutes	Fréquence Ultrasonore		
	23 kHz	412 kHz	960 kHz
5	0,794 g.	0,803 g.	0,947 g.
15	0,933 g.	0,975 g.	1,060 g.

2. *Etude comparative des plantules issues de graines ultra-sonnées sous diverses fréquences :*

a) Poids frais de 50 plantules âgées de 4 jours issues de graines traitées sous une puissance moyenne de 3 W/cm².

Temps de traitement en minutes	Fréquence Ultrasonore		
	23 kHz	412 kHz	960 kHz
10	6,623 g.	6,285 g.	7,065 g.
15	7,380 g.	7,188 g.	7,452 g.

b) Méthode basée sur l'emploi de P_{32} .

Nombre de coups/minute représentant la différence avec les graines témoins dans les cendres des plantules issues des graines d'orge traitées sous une puissance moyenne de 3 W/cm^2 et maintenues pendant 4 jours sur une solution nutritive avec P_{32} .

Temps de traitement en minutes	Fréquence Ultrasonore		
	23 kHz	412 kHz	960 kHz
10	4,700	4,810	4,955
15	4,834	4,975	5,120

3. Contrôle microcalorimétrique de la germination : Respiration.

Pour pouvoir démontrer, par une mesure physiologique rigoureuse, que les différences observées concernaient bien des processus métaboliques, des mesures microcalorimétriques (appareil du Professeur Calvet) ont été entreprises ; nous en verrons plus loin les techniques.

Nous en décrirons, dans le chapitre II, la technique opératoire et noterons seulement ici les résultats intéressant le problème posé en indiquant que les mesures microcalorimétriques permettaient de mesurer directement les quantités de chaleurs dégagées par la germination.

Quantités de calories/grammes dégagées pendant la germination de graines d'orge ultrasonnées sous diverses fréquences, la puissance moyenne étant de 3 W/cm^2 :

Temps de traitement en min.	Fréquence Ultrasonore en kHz				Chaleur en Calories/g. dégagées par la germination après :
	30	80	720	960	
10 min.	2,80	2,34	2,50	1,39	10 heures
20 »	3,50	2,42	2,80	3,02	—
10 »	6,74	5,40	5,05	6,08	20 heures
20 »	8,10	3,02	5,29	5,86	—
10 »	13,80	13,05	12,20	14,00	30 heures
20 »	14,90	17,90	12,50	12,40	—

Des calculs statistiques sur les valeurs en calories/gramme obtenues par intégration des courbes microcalorimétriques, seront présentés dans le Chapitre II relatif à la Microcalorimétrie.

DISCUSSION

Nous avons vu, dans ce chapitre, que les Ultra-sons augmentent la germination.

Il reste encore à démontrer et à confirmer, par une méthode physiologique rigoureuse, que les différences constatées entre les graines traitées et les graines non-traitées reposent sur des processus métaboliques.

C'est pourquoi nous avons envisagé de mesurer directement les quantités de chaleur dégagées par l'augmentation de l'intensité respiratoire, due à la germination. A cet effet, nous avons fait appel à la méthode microcalorimétrique du Professeur E. CALVET, permettant d'enregistrer fidèlement et avec une grande précision, en fonction du temps, de très faibles débits thermiques et de comparer ainsi les courbes représentant la cinétique de la thermogénèse dans le cas des graines traitées et non-traitées aux Ultra-sons.

Rappelons que nos expériences, étant basées sur nos travaux préliminaires au Canada et sur ceux d'autres chercheurs, furent conduites de façon à être réalisées dans les conditions les plus favorables.

CHAPITRE II

*Étude microcalorimétrique
de l'accélération des processus métaboliques*

I) GÉNÉRALITÉS SUR LA MICROCALORIMÉTRIE

La réalisation d'appareils calorimétriques fidèles et de grande sensibilité permettant la mesure des débits de chaleur produits par les phénomènes physiques, chimiques ou biologiques de longue durée, présente un intérêt considérable autant du point de vue thermodynamique que cinétique (thermocinétique).

Application de la microcalorimétrie à la biologie :

La possibilité d'enregistrer, avec une grande précision et à chaque instant, les activités fonctionnelles (métabolisme) des êtres vivants ouvre de nouvelles perspectives de recherches dans tous les domaines de la biologie. Donnons quelques exemples :

a) En plaçant des individus d'espèces différentes dans des conditions identiques, il est possible de comparer leurs thermogrammes et d'en dégager des caractères spécifiques pour chaque

cas particulier (*voir la différence des thermogrammes des graines traitées et non-traitées aux Ultra-sons*).

b) En enregistrant la thermogénèse d'un être vivant à différentes époques de son développement, il est possible de suivre les modifications métaboliques dans le temps.

c) En soumettant des individus se trouvant exactement au même stade de végétation respectivement à diverses conditions extérieures ou intérieures influençant leur développement et leur croissance, comme : température, sécheresse, nutrition, etc. (dans notre cas spécial, traitement aux Ultra-sons), on peut observer, sur les thermogrammes, toutes les modifications subies; et, par comparaison, déceler les changements exercés sur sa physiologie par ces différents facteurs.

Comme aucun phénomène ne se produit dans le métabolisme d'un organisme vivant sans produire ou absorber des calories, on conçoit l'importance du rôle que pourra jouer la microcalorimétrie dans la recherche biologique.

Toutefois, la thermogénèse de tout tissu vivant variant fortement avec la température, pour avoir un sens, un thermogramme doit être établi à température constante. Or, le microcalorimètre CALVET permettant d'opérer sur très peu de matière, les faibles quantités de chaleur produites sont réparties rapidement dans la masse du calorimètre, ce qui fait que la température du matériel ne varie pas sensiblement au cours de l'expérience; le *thermogramme* correspond alors à une température donnée.

Remarque générale sur la thermogénèse d'un être vivant :

La thermogénèse d'un être vivant (dans notre cas des graines de céréales), telle qu'elle s'inscrit sur un thermogramme, est un phénomène assez complexe du fait qu'il comporte la production de calories de différentes provenances. Généralement, il n'est pas très facile de discriminer l'exacte proportion de chacun des composants du début thermique total.

a) Une thermogénèse de base est produite par toute cellule vivante, et correspond à la production d'énergie du métabolisme basal. Cette énergie basale doit être observée et enregistrée en l'absence de toute multiplication cellulaire.

b) En effet, la chaleur produite par un phénomène de division cellulaire peut prendre, dans le cas des graines en germination, une importance prépondérante.

c) D'autre part, dans les thermogrammes peuvent intervenir des dégagements de chaleur non liés à l'activité propre de l'organisme vivant (sous observation), et dus uniquement à des phénomènes physiques et chimiques se passant dans les réserves inertes dont il est chargé (cas des graines).

Description du microcalorimètre E. CALVET, à quatre éléments (1) :

Un bloc cylindrique de cuivre (environ 100 kg) placé dans un thermostat à enceintes multiples, contient quatre alvéoles cylindriques dans lesquelles sont logés quatre éléments microcalorimétriques identiques du type TIAN-CALVET. Chacun de ces éléments comporte une cellule en argent, isolée thermiquement de la masse de cuivre, et reliée à celle-ci par deux thermopiles (16-128 couples chromel-constantan) pouvant être utilisées soit pour mesurer le flux de chaleur sortant de la cellule par création d'une force électromotrice proportionnelle à ce flux, soit pour produire l'effet PELTIER de compensation.

Cela permet donc d'avoir deux sensibilités ; on en réalise une troisième plus faible en plaçant une résistance convenable dans le circuit de la pile de 16 couples. Le bloc de cuivre contient aussi deux galvanomètres et des commutateurs 1, 2, 3 pouvant être manœuvrés de l'extérieur et permettant d'obtenir des montages différentiels sur 3 sensibilités et le montage additionnel-différentiel.

Tous les circuits se trouvent à la température uniforme du bloc de cuivre ; ce dispositif élimine tous les courants thermo-électriques parasites.

II) TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

L'étude de la thermogénèse de la germination de l'orge (variétés « Rika » et « Freja ») traité aux Ultra-sons, a été réalisée suivant la méthode de H. PRAT et E. CALVET [25, 26, 27] en utilisant un gramme de graines d'orge traitées ou non aux Ultra-sons et additionné de 1 ml d'eau distillée. Le dispositif utilisé est représenté sur la figure. Les graines d'orge pesées sont placées dans la cellule laboratoire de l'appareil et l'eau, dans une ampoule de verre mince formée par une pointe effilée. La mise en contact des graines et de l'eau est obtenue en brisant, à l'aide d'une tige poussoir manœuvrée de l'extérieur, la pointe de l'ampoule. Une poire de caoutchouc terminant la tige permet de vider complètement l'ampoule.

On opérait toujours à la température de 25° C, car ce facteur agit sur la thermogénèse germinative en l'accélérant [86, 87, 89].

La température de 25° C a donc été choisie pour éviter un trop grand accroissement de la chaleur dégagée. Enfin, on employait de l'eau distillée pour éviter des déformations des courbes thermogénétiques dues à l'action des substances dissoutes dans l'eau [32]. Les expériences étaient effectuées dans l'obscurité.

(1) « Microcalorimétrie » de E. CALVET et H. PRAT, 1956 (Masson Editeur), Paris.

III) RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX OBTENUS

Dès que l'on fait tomber l'eau sur les graines, on observe un dégagement de chaleur qui croît rapidement, jusqu'à atteindre au bout de 3 à 6 minutes un maximum de $+ 1,5$ cal/h par g de grain. Ensuite, le débit décroît, pouvant s'annuler ou même devenir négatif (absorption de chaleur) au bout de 5 à 7 heures (voir courbe type).

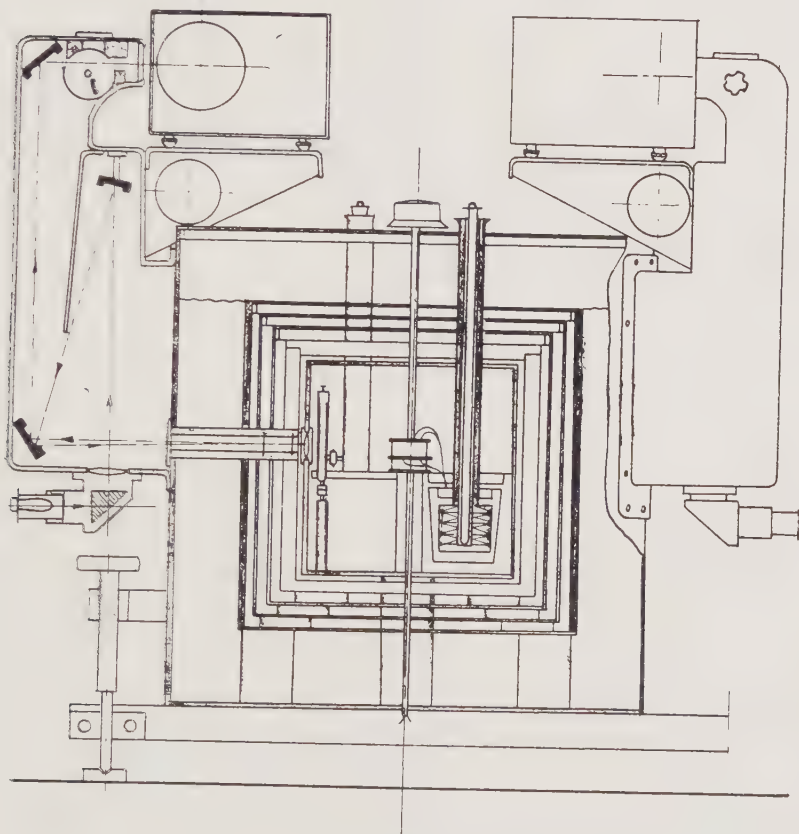


Fig. 1. — Microcalorimètre différentiel type Calvet.

Cette première phase semble résulter de la simple hydratation des graines sèches. On l'appelle « thermogénèse-chimique » pour la distinguer des phases ultérieures qui mettent en jeu l'activité des cellules vivantes. Cette phase de la thermogénèse dérivant immé-

diatement de l'humidification, est particulièrement importante pour la vie des plantules car elle comporte les divers phénomènes (absorption d'eau, imbibition des colloïdes, dissolution, etc.) se produisant au cours de cette phase, ainsi qu'une modification des réserves chimiques en raison du commencement de mobilisation des enzymes, entraînée par chaque humidification.

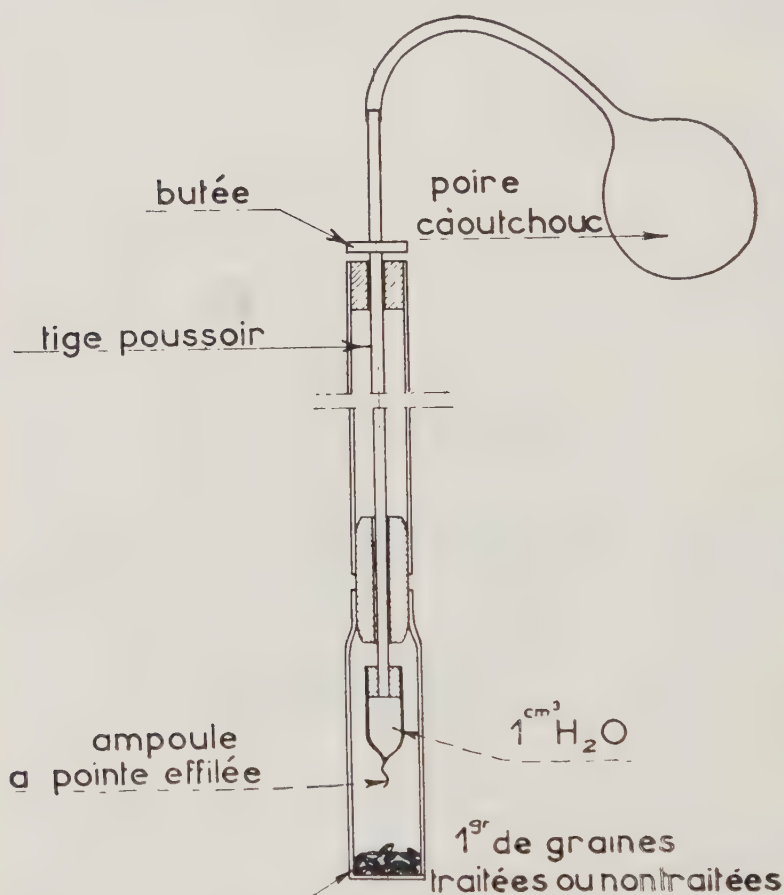


Fig. 2. — Dispositif spécial pour l'étude de la thermogénèse de la germination suivant la méthode de MM. Prat et Calvet.

Puis le débit thermique se relève progressivement, par suite de l'entrée en jeu des phénomènes physiologiques de la germination (accroissement de l'intensité respiratoire, intervention des enzymes hydrolisant les réserves des graines, etc.)

Par intégration des courbes après 10, 20 et 30 heures d'enregistrement, on a pu suivre la variation en fonction du temps de la quantité de chaleur dégagée au cours de la germination.

La simple comparaison des quantités de chaleur dégagées en opérant sur des graines traitées et non-traitées montre que les Ultra-sons produisent une accélération très nette de la germination. Il semble que, dans nos conditions opératoires et dans les limites des puissances acoustiques utilisées par nous, cette action ne soit pas, comme on l'a déjà vu, liée à la longueur d'onde, mais dépende de la puissance.

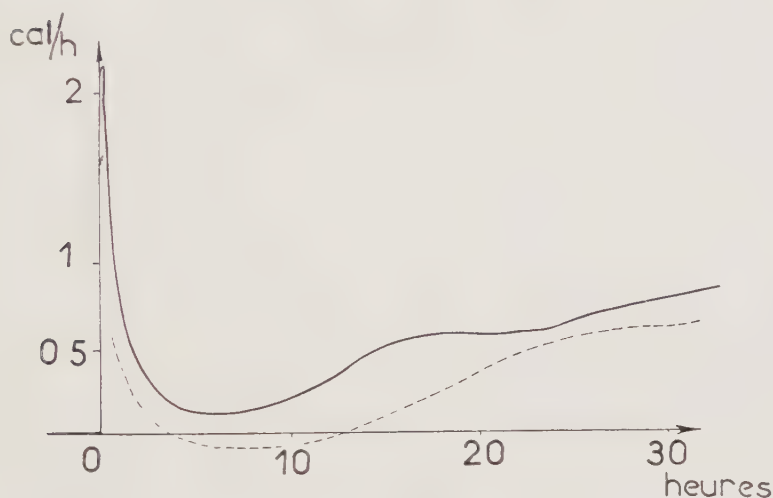


Fig. 3. — Thermogénèse d'orge traité aux Ultra-sons.

Traitement —————
Témoins - - - - -

Traitement 30 KHz - 2,5 W/cm² - 20 min.

Quantité de chaleur enregistrée (cal.)

Traitement : 3,5 cal en 10 h ; 8,1 cal en 20 h ; 14,9 cal en 30 h.

Témoin : 0,705 cal en 10 h ; 1,35 cal en 20 h ; 6,65 cal en 30 h.

Dans certains cas, on a observé que les courbes de thermogénèse germinatives de graines traitées et non-traitées se recoupent ou se confondent, ce qui confirmerait les résultats de GLAUSER [50] et de SASAGAWA [102] relatifs à l'influence de la puissance ultrasonore appliquée et de la longueur d'onde lesquelles donnent des effets spécifiques avec des seuils comme le font d'autres agents physiques ou chimiques.

D'autre part, le taux d'humidité des graines mises en œuvre exerçant une grande influence sur l'allure de la thermogénèse

physico-chimique et de la thermogénèse biologique, il était important de ramener, par dessiccation, les graines ultrasonnées à leur teneur en eau initiale [82]. Cette précaution est d'ailleurs indispensable pour permettre de réaliser, au début de l'expérience, la

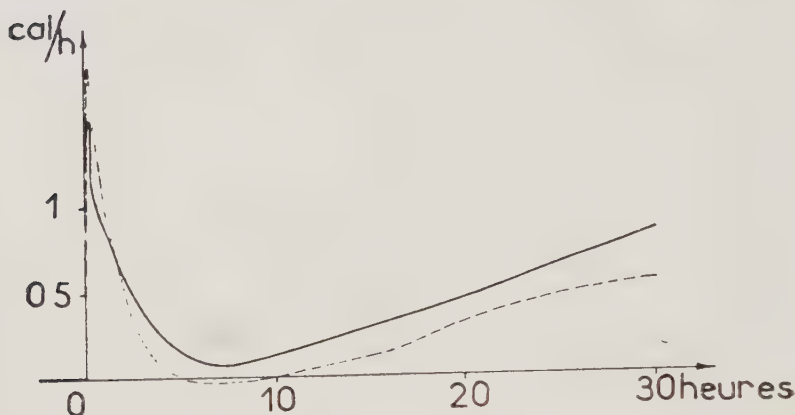


Fig. 4. — Thermogénèse d'orge « Fréja » traité aux Ultra-sons.

Traitement —————

Témoïn - - - - -

Traitement 720 KHz - 0,4 Amp. 3,5 W/cm² - 20 min.

1 g d'orge + 1 cc H₂O distillée.

Quantité de chaleur enregistrée en cal. :

Traitement : 2,8 en 10 h ; 5,75 en 20 h ; 12,5 en 30 h.

Témoïn : 2,4 en 10 h ; 3,38 en 20 h ; 7,6 en 30 h.

stabilisation du zéro du microcalorimètre et cela en raison du dégagement de chaleur produit par la germination *prématurée* des graines *humides*. En outre, ces graines déjà *humides* ne prenant que très peu d'eau au cours de l'essai microcalorimétrique proprement dit, la phase physico-chimique de la thermogénèse est écourtée, ce qui ne permet plus une étude correcte des divers phénomènes (absorption d'eau, imbibition des colloïdes, dissolution, etc.) se produisant au cours de cette phase.

Un examen attentif des courbes nous montre que la partie de la thermogénèse physico-chimique correspondant à l'humectation des graines est écourtée dans le cas des graines traitées et qu'elle est suivie d'une période de latence très brève.

En d'autres termes, la phase de latence devient rapidement exothermique contrairement à ce qui se passe dans le cas des graines non-traitées, pour lesquelles elle demeure endothermique un certain temps. En outre, on peut remarquer que, pour tous les traitements de durées variables effectués à diverses fréquences,

on observe, sur les courbes, un dégagement de chaleur plus important, se produisant 15 à 16 heures après le début de l'expérience microcalorimétrique. Ce phénomène peut être attribué à un brusque dégagement de chaleur des graines.

Enfin, les données relatives aux quantités de chaleur dégagées (exprimées en calories) rassemblées dans le tableau suivant, mettent en évidence, de façon indiscutable, l'effet stimulant des Ultra-sons.

TABLEAU A

Thermogénèse d'orge traité aux Ultra-sons.

1 g d'orge + 1 ml d'eau distillée.

Fréquence (utilisée)	Temps du traitem. minute	Quantité de chaleur enregistrée (cal.) en :					
		<i>Traitement</i>			<i>Témoin</i>		
		10 h.	20 h.	30 h.	10 h.	20 h.	30 h.
960 kHz 5 W/cm ²	15	6,70	14,48	—	2,44	4,12	—
960 kHz 0,4 amp. 3,5 W/cm ² ...	5 10 15 20 25	1,30 1,39 4,30 5,95 1,78	5,43 6,08 8,80 11,24 3,56	— — 16,70 13,50 (2) 7,60	— 0,66 2,42 — 1,69	1,42 1,68 5,90 — 3,76	3,53 (1) — 13,05 — 8,95
720 kHz 0,4 amp. 3 W/cm ²	10 15 20	2,50 2,19 2,80	5,05 3,55 5,75	12,12 8,02 12,50	0,55 1,53 2,40	0,85 2,36 3,58	2,82 5,00 7,60
80 kHz 4 W/cm ²	10 15 20	2,34 2,50 2,42	5,4 5,63 3,02	13,05 12,15 7,50	1,70 2,42 1,12	3,04 4,26 1,82	8,10 8,10 4,80
30 kHz 2,5 W/cm ²	10 15 20	1,58 3,75 3,50	3,20 7,75 8,10	9,55 15,60 14,90	1,78 2,85 0,71	3,18 3,72 1,35	8,35 8,30 6,65

(1) 3,53 pour 27 h.

(2) 13,50 pour 26 h. (courbe différentielle).

L'expérience présentée dans le thermogramme différentiel fut effectuée simultanément dans 2 cellules par des graines traitées et non-traitées et conduite de manière à ce que les ordonnées négatives de la courbe correspondant à l'enregistrement des calories dégagées par le témoin et les ordonnées positives à celui des calories dégagées par les graines traitées. *La courbe microcalorimétrique différentielle étant positive*, l'effet activant du traitement est ainsi démontré.

IV) INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats obtenus confirment les études antérieurement entreprises à l'aide de diverses méthodes et notamment de celles basées sur le pourcentage de germination, sa vitesse et la teneur en eau. Nos travaux avec le P_{32} ont montré que l'accélération de la croissance des graines d'orge soumises aux Ultra-sons paraît

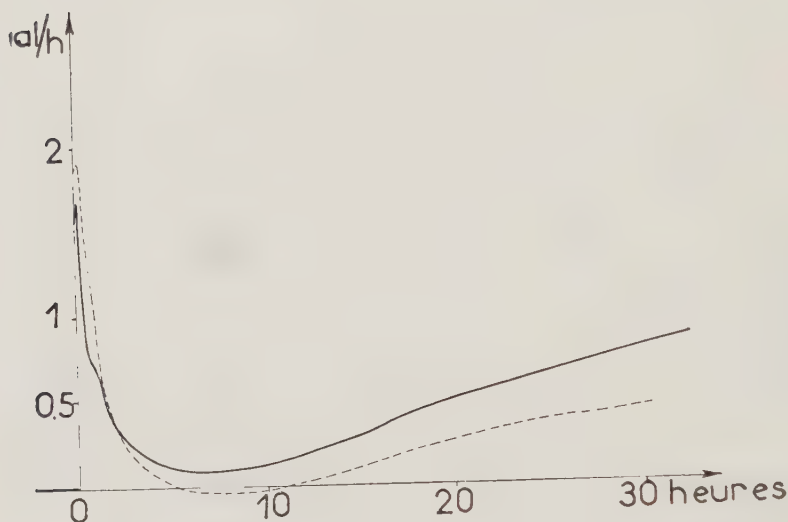


Fig. 5, — Thermogénèse d'orge « Fréja » traité aux Ultra-sons.

Traitement —————

Témoin - - - - -

Traitement 960 KHz - 0,4 amp. 3,5 W/cm² - 20 min.

1 g d'orge + 1 cc H₂O distillée brisant la pointe de l'ampoule contre les graines.

Quantité de chaleur enregistrée en cal. :

Traitement : 3,02 en 10 h ; 5,86 en 20 h ; 12,4 en 30 h.

Témoin : 2,39 en 10 h ; 3,06 en 20 h ; 6,30 en 30 h.

liée, au moins en partie, à une modification irréversible de la perméabilité des téguments de la graine, ce qui est en accord avec ce que l'on sait des actions physiques des ultra-sons sur les potentiels des membranes [14, 20, 45]. Mais cette activation peut être ralentie, et la mort du germe pourrait même s'ensuivre, si on prolongeait la durée de l'application. En d'autres termes, les ondes ultrasonores produiraient, par une application de trop longue durée, une destruction traumatique de la structure cellulaire [7, 102].

Il est probable que c'est le protoplasma cellulaire lui-même

qui est influencé par les Ultra-sons, du point de vue structural et fonctionnel.

Nous nous bornons ici à rappeler la théorie moderne portant sur la structure moléculaire de la cellule telle qu'elle apparaît d'après les recherches de polarisation optique du Zoologiste W. J. SCHMIDT [105, 106], ainsi que du Professeur FREY-WYSSLING.

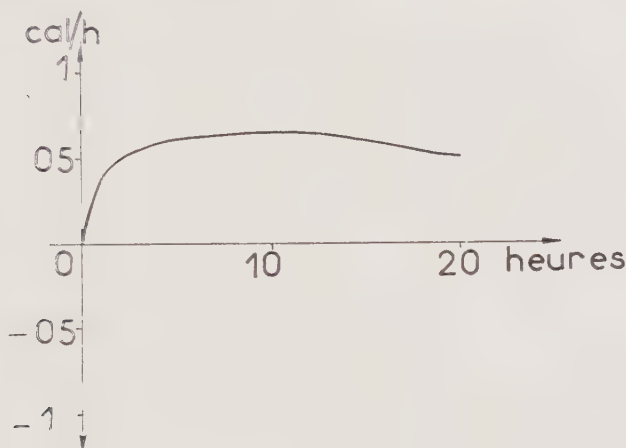


Fig. 6. — Thermogénèse d'orge « Fréja » traité aux Ultra-sons.

Traitement —————

Traitement 960 KHz - 0,4 Amp. - 3,5 W/cm² - 20 min.

Courbes différentielles.

1 g d'orge + 1 cc H₂O distillée (trait. et témoin).

Quantité de chaleur enregistrée (cal.) :

5,45 pour 10 h ; 11,24 pour 20 h.

Selon eux, on trouverait, dans le protoplasma, des molécules filiformes formant une grille à trois dimensions et présentant, dans leur structure micellaire, une sorte de squelette submicroscopique du protoplasma. Tous les autres éléments cellulaires se trouvent placés dans cette grille.

On comprendra que, sous l'action des Ultra-sons, tout ce système entre en vibration, la vitesse relative acquise par une particule dépendant de sa masse, de la fréquence et d'un coefficient de résistance dans le liquide.

Le fait que le phénomène de l'accélération de la germination continue à se manifester longtemps (plusieurs semaines ou plusieurs mois) après le traitement, pourrait s'expliquer par des modifications structurales permanentes provoquées par le traitement

ultrasonore, ces effets étant liés à la durée du traitement et aux fréquences employées.

L'ensemble de ces résultats incite à penser qu'il ne se produit pas seulement une modification des membranes, mais probablement des effets mécaniques et biochimiques plus profonds, et dont l'influence se manifeste (au cours de la croissance) par une accélération générale du métabolisme.

RÉSUMÉ.

Ces courbes de thermogénèse (thermogramme) montrent que la durée de la thermogénèse physico-chimique caractérisée par la première pointe exothermique est diminuée dans le cas des graines traitées et que le phénomène passe alors rapidement de la phase physico-chimique à la phase de thermogénèse biologique, la deuxième phase pouvant même se superposer à la phase physico-chimique.

Ce phénomène d'accélération de la germination se manifestant de la même manière sur des graines fraîchement ou anciennement traitées, il apparaît que l'action des Ultra-sons est irréversible et correspond essentiellement à une modification de la perméabilité des membranes, avec possibilité en même temps d'action dépolymérisante (dépolymérisation de l'amidon en dextrine) [52, 54, 92, 93].

D'autre part, le fait que les grains d'orge traités aux Ultra-sons montraient une plus grande affinité pour l'eau que les témoins, pourrait être aussi expliqué par le gonflement des structures colloïdales dû à une « solvation » plus rapide.

V) ANALYSE STATISTIQUE DES DÉBITS DE CHALEUR PRODUITS PAR LA GERMINATION

Sur tous les thermogrammes précédents, correspondant à des traitements de durées variables effectués à diverses fréquences, on observe un débit thermique plus important que sur ceux relatifs aux témoins, ce phénomène pouvant être attribué à un brusque dégagement de chaleur des graines.

Il était donc très important de pouvoir analyser et préciser, par un calcul statistique, la signification des résultats obtenus.

Dans les tableaux ci-après, nous avons noté les quantités de chaleur dégagées au cours de la germination, en fonction du temps, et indiqué brièvement les détails de notre calcul.

Nous avons vu précédemment (Tableau A) que la quantité de chaleur produite par la germination dépend de la puissance ultrasonore appliquée, de la longueur d'onde et de la durée du

traitement, lesquelles donnent des effets caractéristiques avec des seuils comme le font d'autres agents physiques ou chimiques.

Il importe de souligner que la précision des mesures microcalorimétriques nous permet d'obtenir des résultats statistiques significatifs, même sans répétition des essais.

Ceci est d'autant plus important que, dans le cas où les expériences sont de longue durée (30 à 48 h pour la germination des graines, 14 jours pour une expérience avec des bactéries, etc.) des répétitions de la même expérience ne sont pas toujours possibles. Malgré cela, l'analyse de variance des données nous montre que les quantités de chaleur enregistrées sont très significatives (effet principal H. ainsi que les interactions $F \times H$ et $H \times T$).

Analyse de variance.

Source de Variation	D.F.*	S.S.*	M.S.*	F
Total	71	1226,34		
F. Fréquences	3	45,30	15,10	<1
H. Heures (intégrations des courbes après 10, 20 et 30 heures)	2	743,58	371,79	10,66**
R. Temps du traitement	2	20,14	10,07	<1
Tus - Traitement aux U.S. ..	1	198,10	198,10	5,23*
$F \times H$	6	18,38	3,06	5,37**
$F \times R$	6	64,61	10,77	18,90**
$F \times Tus$	3	13,85	4,62	8,11**
$H \times R$	4	4,64	1,16	2,04
$H \times Tus$	2	63,60	31,80	55,89**
$R \times Tus$	2	5,24	2,62	4,60*
$F \times H \times R$	12	21,61	1,80	3,16*
$F \times H \times Tus$	6	2,94	0,49	<1
$F \times R \times Tus$	6	13,66	2,28	4,00*
$H \times R \times Tus$	4	3,82	0,96	1,68
$F \times H \times R \times Tus$	12	4,87	0,57	

(1) D.F. = Degré de liberté ; S.S. = somme des carrés ; M.S. = moyenne des carrés ; F. = variance ; * = significatif ; ** = très significatif.

Comme ces valeurs sont obtenues par l'intégration des courbes, la microcalorimétrie nous donne la possibilité de faire des calculs spéciaux pour chaque partie de la courbe. Autrement dit, on peut faire une analyse statistique précise de la partie représentant la *thermogénèse physico-chimique* ainsi que de celle représentant la *thermogénèse biologique*.

Il est d'autre part possible, sur une même courbe, de faire varier l'intervalle d'intégration du début thermique pour des durées quelconques, ce qui permet de multiplier les données numériques du calcul statistique.

Dans le cas d'expériences de durées moins longues, permettant de réaliser plusieurs essais sur le même échantillon, le calcul statistique relatif à l'interprétation des résultats obtenus sera simplifié et conduit d'une manière légèrement différente.

Soulignons enfin le fait que, dans l'analyse de variance, l'effet du traitement aux Ultra-sons est particulièrement mis en évidence :

— Ainsi, « effet principal T » significatif montre qu'en moyenne il y a augmentation du nombre de calories lorsqu'on passe du témoin au traité.

D'autre part, l'interaction significative $T \times H$ montre que la différence du nombre de calories entre traité et témoin s'accroît quand la durée H passe de 10 à 20 h, puis de 20 à 30 h.

CHAPITRE III

Action des ultra-sons sur l'activité enzymatique.

Certaines recherches relatées dans les chapitres précédents, tels que les essais effectués avec du phosphore radioactif (P_{32}), ainsi que le fait qu'une accélération de la germination se manifeste plusieurs semaines ou plusieurs mois après le traitement des graines, incitent à penser qu'il y aurait encore d'autres phénomènes en jeu.

Une étude attentive des courbes microcalorimétriques révèle qu'un certain changement se produit dans les graines traitées, au stade de thermogénèse physico-chimique précédant le dégagement de chaleur plus important qui se produit 15 à 16 heures après le début de l'expérience microcalorimétrique.

Tout ceci laisse supposer que l'effet produit par les ondes ultrasonores, en raccourcissant la durée de la thermogénèse germinative qui représente la somme de différents processus physiques et chimiques (absorption, imbibition, gonflement des colloïdes, dissolution, etc...) doit être dû à des changements biologiques profonds.

C'est pourquoi il était d'un grand intérêt de pousser les recherches dans le domaine enzymologique, domaine pour lequel l'action possible des Ultra-sons a été jusqu'à présent assez peu étudiée.

Comme la plus grande partie des réserves nutritives d'une graine se compose d'amidon (voir endosperme des graines), l'étude d'une accélération possible de l'activité d'un enzyme hydrolysant

cet amidon a été envisagée. Etant donné que certaines techniques étaient déjà connues pour l'analyse des amylases (alpha et bêta) dans les farines et les céréales ainsi que dans le malt, nous décidâmes d'étudier l'action des Ultra-sons sur l'alpha-amylase.

Ayant observé un accroissement de l'activité de cet enzyme pouvant être partiellement attribué à une plus grande perméabilité des téguments, il était logique d'entreprendre l'étude de l'activité de la cellulase, enzyme attaquant les parois cellulaires de l'endosperme.

Nous sommes ainsi amenés à distinguer, dans le présent chapitre, deux parties consacrées respectivement à l'amylase et à la cellulase.

1^{re} PARTIE

ACTION DES ULTRA-SONS SUR L'ALPHA-AMYLASE

1^o GÉNÉRALITÉS

Un des enzymes les plus importants hydrolysant l'amidon durant la germination est l'alpha-amylase. Dans des graines en état de repos, celle-ci se trouve en majeure partie dans les cellules entourant l'embryon, ainsi que dans le scutellum ; l'endosperme même n'en contient que de très petites quantités, principalement situées dans la région du scutellum et des cellules d'aleurone.

Au début de la germination, le scutellum diffuse des quantités de plus en plus importantes d'amylase vers les régions voisines de l'endosperme. Ce fait peut être attribué à des processus physico-chimiques : l'amidon ayant une grande affinité d'absorption pour les amylases et celles-ci possédant certaines propriétés de diffusion au cours de l'imbibition des graines par l'eau, une absorption des amylases en contact avec l'amidon environnant se produit : ceci amène un déséquilibre dû à l'appauvrissement du milieu voisin, l'équilibre étant rétabli par de nouvelles quantités d'amylases provenant du scutellum.

Comme les traitements aux Ultra-sons s'effectuent dans l'eau, un déclenchement important des processus décrits ci-dessus pourrait être provoqué par le traitement. Il était donc d'intérêt de voir s'il se produisait une augmentation sensible de la teneur en amylase des graines traitées par rapport à celles uniquement passées à l'eau, ceci pouvant expliquer une accélération de la germination.

2° DOSAGE DE L'ALPHA-AMYLASE

a) PRINCIPE :

Il existe de nombreuses méthodes pour l'évaluation de l'activité alpha-amylasique [68, 95, 101, 107]. Elles sont basées sur l'examen de modification du substrat, au cours de l'hydrolyse :

1) Accroissement du pouvoir réducteur d'une solution d'amyllopeptine ou d'amidon soluble.

2) Changement des propriétés de coloration par l'iode du substrat.

3) Diminution de viscosité d'un empois d'amidon.

Tous ces phénomènes sont caractéristiques de l'action de l'alpha-amylase.

Quant à nous, nous avons adopté une méthode de microdextrinisation basée sur le procédé de KNEEN, SANDSTEDT et HOLLENBECK, permettant de déterminer des traces d'alpha-amylase. Ces auteurs, pour éviter l'interférence de l'action de la β -amylase, utilisent un substrat ayant subi une prédigestion par cet enzyme. Ils mesurent dans des conditions standardisées le temps nécessaire pour qu'une quantité d'extrait enzymatique dégrade le substrat jusqu'à ce qu'il donne à l'iode une coloration préalablement fixée.

Comme des graines sèches ne contiennent que des quantités minimales de cet enzyme, cette méthode convient particulièrement, attendu que les graines traitées sont ramenées à l'état de siccité initial après le traitement. Elle présente, sur les autres méthodes, l'avantage de permettre la détermination de l'activité de très petites quantités d'enzyme par un procédé de dextrinisation à basse température.

La macro-méthode de dextrinisation de l'alpha-amylase [95] n'exige qu'un temps assez court (environ 20 minutes) pour que, par réaction de l'extrait enzymatique sur le substrat, on obtienne la teinte fixée à coloration par l'iode. Par contre, la micro-méthode demande une digestion préliminaire du substrat, de longue durée — toute une nuit — avec l'extrait enzymatique. Le substrat ayant subi cette digestion préliminaire est traité, parallèlement à celui d'un essai témoin (sans enzyme), par une quantité standard de préparation d'alpha-amylase d'activité connue, et on détermine, dans chaque cas, le temps nécessaire pour obtenir la coloration fixée. L'activité de l'alpha-amylase est alors calculée d'après la différence entre le temps de dextrinisation du substrat ayant subi une digestion préliminaire et celui de l'essai témoin.

b) DÉTAILS DE LA TECHNIQUE OPÉRATOIRE :

Substrat A) préparer un jour avant l'essai.

Dans un récipient de 300 ml, introduire 200 ml d'eau distillée que l'on porte à l'ébullition. Ajouter quantitativement une suspension aqueuse froide de 5,0 g (en poids sec) d'amidon soluble selon LINTNER (MERCK) et cela à une vitesse telle que l'ébullition ne soit pas arrêtée ; maintenir l'ébullition 2 minutes.

La comparaison a été effectuée à l'électrophotomètre de MEUNIER selon la technique mise au point par GUILBOT au Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales.

En lumière orangée (écran 570 m) : la coloration de référence de la solution minérale versée dans la cuve de 1 cm de large est repérée par rapport aux divisions du tambour de l'électrophotomètre : division 143. On examine ensuite l'évolution de la teinte du mélange solution d'iode + milieu réactionnel en fonction du temps, à l'électrophotomètre. Par interpolation, on repère le temps correspondant à la division 143, toutes conditions égales.

Extraction.

70 grains d'orge « Rika » sont broyés avec 3,5 g de sable de quartz et 8 ml de solution de Cl_2Ca de 0,2 p. 100 et transvasés dans un tube à centrifuger en complétant à 25 ml par la solution de Cl_2Ca (broyage 5 minutes - transvasement 5 minutes - agitation 5 minutes) + (15 minutes à 30°C dans bain-marie) = 30 minutes. Dans certains essais le temps de contact a été porté à 1 heure.

Centrifuger pendant 5 minutes. Filtrer sur papier filtre DURIEX N° 120.

Détermination.

Digestion préliminaire

Dans l'après-midi du jour précédant l'analyse, on introduit 20 ml de substrat dans les Erlenmeyers de 125 cc. on ajoute 7 ml d'extrait, on bouche et on laisse jusqu'au lendemain au bain-marie à 30° C.

En même temps, un témoin est préparé en ajoutant 8 ml de Cl_2Ca à 0,2 p. 100 à 20 ml de substrat et mettant au bain-marie.

L'instant de mise en contact de l'extrait avec le substrat est noté.

Digestion secondaire.

Echantillon-témoin. — 3 ml de solution standard d'alpha-amylase, à 30° C sont ajoutés aux 27 ml du substrat-témoin se trouvant au bain-marie depuis la veille. On note l'instant où l'enzyme est ajoutée ainsi que celui de la fin de la dextrinisation, déterminée à l'électrophotomètre.

Le temps nécessaire à la dextrinisation du témoin est alors exprimé en minutes (t_2).

Echantillon pour analyse. — 3 ml de solution standard d'alpha-amylase à 30° C sont ajoutés aux 27 ml du mélange substrat-extrait ayant subi la prédigestion pendant la nuit. On note également l'instant de l'addition de l'enzyme et celui de la fin de dextrinisation. Pendant tout le temps, les substrats sont constamment maintenus à 30° C dans le bain-marie.

Le temps (t_3) nécessaire à la dextrinisation du substrat additionné d'extrait le jour précédent est moindre que celui (t_2) du témoin, si l'extrait a une activité alpha-amylasique.

Le temps de la pré-digestion (t_1) représente le temps en minutes depuis que l'extrait fut ajouté au substrat le jour précédent, jusqu'à l'heure où la solution d'enzyme fut ajoutée pour la digestion secondaire.

c) CALCULS :

L'unité d'activité alpha-amylasique est définie selon SANDSTEDT KNEEN et BLISH (1939) comme la quantité d'alpha-amylase qui (sous l'influence d'un excès de bêta-amylase) peut dextriniser 1 g d'amidon soluble bouilli, en 1 heure à 30° C (exprimée ici en unités pour 100 grains d'orge).

L'activité de l'alpha-amylase est alors calculée d'après la formule suivante :

Unité d'alpha-amylase par 100 grains d'orge

$$\frac{24}{c \times t_1 \times \frac{t_2}{t_2 - t_3}} \quad (1)$$

c = nombre de grains ajoutés au substrat.

t_1 = temps de la pré-digestion (minutes)

t_2 = temps de dextrinisation du témoin (minutes).

t_3 = temps de dextrinisation de l'échantillon (minutes)

Certains détails ci-dessus décrits apportent quelques modifications à la méthode originale et constituent une adaptation de cette dernière à notre cas particulier.

Pour toutes les données originales, voir : KNEEN E., SANDSTEDT R. M., et HOLLENBECK C. M. [70]. The differential stability of the malt-amylase-separation, of the alpha and beta components, Cereal Chem. 20 : 399-423 (1943), cité par STONE J. [112].

3° RÉSULTATS OBTENUS

a) SUR DES EXTRAITS DE GRAINS D'ORGE A L'ÉTAT DE REPOS.

Nous présentons, dans le tableau suivant, un exemple des résultats obtenus par application de la microméthode (voir tableau page suivante).

Exemple I : Orge trait. 960 kHz - 2,5 W/cm²-5 minutes.

	Temps de préli- gation en mi- nutes t_1	Temps de dex- trinitisation après prédigestion	Indication de l'écrophoto- mètre	Temps de dextri- nisation en min. pour l'indic. 143	Activité alpha- amylase p. 100 grains calculée selon (1)
Essai à blanc	1125	28'30'' 30'35'' 32'05'' 33'15'' 35'45''	174 161 154 146 138	$t_2 = 34'25''$	
Orge témoin 00 non trempée non traitée	1125	20'40'' 22'20'' 23'30'' 24'15'' 25'30''	165 150 146 144 138	$t_3 = 24'28''$	0,031
Orge témoin trem- pée 5 min. dans l'eau sans U.S. ...	1125	20'50'' 23'15'' 24'25'' 25'20''	170 151 147 143	$t'_3 = 25'20''$	0,028
Orge traitée 5 min. dans l'eau avec U.S.	1125	15'35'' 17'40''	105 96	$t''_3 = 6'43''$	0,086

Pour des raisons de calculs statistiques, on a été amené à faire 2 témoins : un extrait d'orge non traité, non trempé (témoin 00) et un extrait d'orge non traité et trempé, le même temps que l'orge traitée (témoin X minutes).

Nous avons résumé, dans un second tableau ci-dessous, quelques-uns des résultats obtenus avec des orges ayant subi des durées différentes de traitement aux Ultra-sons.

L'activité alpha-amylasique après un traitement aux Ultra-sons, fut analysée statistiquement et a montré que, seuls, les traitements de 5 et 10 minutes étaient significatifs.

b) SUR DES EXTRAITS DE GRAINS D'ORGE GERMÉS :

Nous mentionnons quelques essais préliminaires faits à l'aide de la macrométhode sur des graines germées et qui nous ont donné les résultats suivants :

		Activité alpha-amylasique p. 100 grains calculée selon (1) $\frac{24}{c \times t_1 \times \frac{t_2}{t_2-t_3}}$			
		ESSAI 1	ESSAI 2	ESSAI 3	ESSAI 4
Orge ultra-sonnée 5 minutes	Témoin 00	0,031	0,025	0,033	0,019
	Témoin 5 min. .	0,028	0,029	0,027	0,024
	Traité 5 min. . .	0,086	0,073	0,074	0,074
Orge ultra-sonnée 10 minutes	Témoin 00	0,015	0,017	0,012	0,025
	Témoin 10 min. .	0,028	0,029	0,030	0,035
	Traité 10 min. .	0,037	0,039	0,036	0,042
Orge ultra-sonnée 15 minutes	Témoin 00	0,010	0,019	0,012	0,017
	Témoin 15 min. .	0,024	0,015	0,020	0,029
	Traité 15 min. .	0,032	0,021	0,028	0,032

Echantillons	Durée de germination		Activité alpha-amylasique pour 100 grains
Orge ultrasonnée 5 minutes à 960 kHz	100 h	Témoin 00 Témoin 5 min. Traitément 5 min. U.S.	= 2,67 = 2,86 = 3,12
Orge ultrasonnée 10 minutes à 960 kHz	45 h	Témoin 00 Témoin 10 min. Traité 10 min.	Trop faible pour être mesurée = 0,98 = 10,60

Ces chiffres relatifs à la germination, quoique provisoires, donnent un aperçu du développement des quantités enzymatiques dans le temps.

Il est intéressant de noter que nos expériences conduisent à des résultats semblables à ceux obtenus par RUBAN E. L. et DOLGOPOLOV N. M. [97] qui ont étudié l'activation des diastases par des traitements aux Ultra-sons, leurs essais ayant porté sur des graines de blé, d'avoine et d'orge.

Nous discuterons plus complètement ces résultats, en même temps que ceux obtenus avec la cellulase et les enzymes de la Vanille.

2^e PARTIE

ACTION DES ULTRA-SONS SUR LA CELLULOSE

1^o GÉNÉRALITÉS

La cellulase, souvent désignée sous le nom de « cytase », est un enzyme qui attaque les parois cellulaires et les rend plus perméables.

Ainsi que l'amylase, la cellulase est, pendant la germination, infusée dans l'albumen par le scutellum. BROWN et MORRIS (*Journal Chemical Soc.*, 57, 548 (1890) ou *Botan. Ztg* 462 (1892) parvinrent, pour la première fois, à obtenir cet enzyme en même temps que l'amylase par précipitation d'un extrait aqueux du malt avec de l'alcool.

Les parois de l'endosperme, comme toutes les autres parois cellulaires, sont constituées par des hémicelluloses polymères d'hexoses et de pentoses et comprenant de l'Araboxylane. D'autres chercheurs ont encore pu trouver du Galactoxylane dans les membranes cellulaires de l'endosperme de l'orge.

Le ferment cytolitique (cellulase) pénètre dans les membranes formées d'hémicelluloses et par un effet d'hydrolyse (gonflement des parois) les rend « hyalines », autrement dit diminue leur pouvoir d'absorption de la lumière, spécialement dans le cas de la lumière polarisée.

Par cet effet d'hydrolyse, l'hémicellulose est transformée en produits de masse moléculaires plus petites, comparables à celles des dextrines d'amidon, sans pourtant aller jusqu'à la dissolution ; autrement dit, sous l'action de plus en plus intense de la cellulase durant la germination, les parois cellulaires passent d'un état rigide à un état plus disloqué.

N'étant pas biochimiste, il m'est impossible de présenter et de discuter tous les effets ou réactions biochimiques possibles, mais je tiens à donner un aperçu général de l'action de cet enzyme et de l'intérêt que cette action peut présenter pour notre étude sur l'effet des Ultra-sons.

La majeure partie des recherches relatives à l'activité de la cellulase ont été effectuées en utilisant, comme source de cet enzyme, l'escargot *Helix pomatia*. Ce n'est qu'au cours des dernières années que des recherches ont été entreprises sur l'activité de cet enzyme dans le malt.

Dans l'ouvrage le plus récent : « *Methods in Enzymology* » Academie Press Inc. New-York 1955, Georges de Stevens indique qu'il n'existe pas de méthode d'une reproductibilité absolue pour mesurer l'activité de la cellulase, par suite de l'hétérogénéité de la réaction, ainsi que de l'effet physique du substrat cellulosique.

En raison de toutes ces difficultés, on ne trouve que très peu de travaux donnant une méthode pratique pour déterminer aisément l'activité de cet enzyme.

C'est pourquoi il y avait intérêt à adapter la méthode du D^r ENEBO et SANDERGREN de l'Université de Stockholm (Suède), méthode se révélant comme la plus facilement applicable, la moins coûteuse, et donnant des résultats très satisfaisants.

Toutefois, étant donné que la méthode du D^r ENEBO a pour base l'action de l'enzyme sur un substrat artificiel, il était intéressant d'étudier comparativement cette même action enzymatique sur un substrat naturel (bêta-glucosane), d'après la méthode du D^r PREECE, d'Edimbourg (Ecosse).

Cette méthode est basée, comme celle du D^r ENEBO, sur un changement de viscosité du substrat produit par l'action de l'enzyme. Mais, étant données les petites quantités de bêta-glucosane (2-3 g pour 1 kg d'orge) qu'on obtient par fractionnements et précipitations successifs avec du sulfate d'ammonium à 20 p. 100, il n'est pas toujours facile de produire des quantités suffisantes de ce substrat. Le D^r PREECE a eu personnellement la grande amabilité de m'envoyer 0,5 g de bêta-glucosane pour faciliter mes recherches.

Ainsi, les déterminations relatives à l'activité de la cellulase peuvent être effectuées par les méthodes suivantes :

1. MESURE DE L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME SUR UN SUBSTRAT SYNTHÉTIQUE (Ethyl-hydroxyéthylcellulose) en utilisant :

- a) soit un viscosimètre de OSTWALD.
- b) soit un viscosimètre de HÖPPLER.

2. MESURE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE SUR UN SUBSTRAT NATUREL (Beta-glucosan) PAR EMPLOI DU VISCOSIMÈTRE D'OSTWALD

A) MODIFICATION APPORTÉE A LA MÉTHODE ENEBO [44].

N'ayant pas de viscosimètre Höppler, nous avons dû utiliser un viscosimètre Ostwald en essayant de nous rapprocher le plus possible des données de la méthode décrite ci-dessus.

a) *Détermination de la densité :*

La densité du mélange extrait + substrat, ainsi que celle du mélange substrat + NaCl (1 : 1) furent déterminées avec un picnomètre, d'après la formule :

$$\text{Densité } D = \frac{M_T}{M'_T} \cdot (e_T - a) + a \quad (1)$$

M_T = poids du liquide à la température T

M'_T = poids de l'eau à la température T.

e_T = densité de l'eau à la température T.

a = facteur arbitraire = 0,0012.

Substrat + NaCl (O.I.N.) — 30° C.

$$\begin{aligned} D &= \frac{24\,318}{24\,178} (0,9957 - 0,0012) + 0,0012 = \\ &= (1,0058 \times 0,9945) + 0,0012 = 1,0015 = 1,002. \end{aligned}$$

Substrat + Extrait (1 : 1) — 30° C.

$$\begin{aligned} D &= \frac{24\,378}{24\,178} (0,9957 - 0,0012) + 0,0012 = \\ &= (1,0082 \times 0,9945) + 0,0012 = 1,0039 = 1,004. \end{aligned}$$

b) Concentration :

Etant donné que les extraits d'orge « Rika » étaient très actifs, on a utilisé, pour les travaux avec le viscosimètre d'OSTWALD, une concentration plus forte du substrat afin de suivre plus facilement l'action enzymatique. C'est pourquoi la plus grande partie des expériences a été faite avec une concentration $C_s = 11$.

c) Viscosité absolue :

Comme les expériences étaient faites avec un tube viscosimétrique BAUMÉ (OSTWALD), la viscosité absolue était donnée en unité C.G.S.

$$\eta = Kdt$$

d = densité du liquide

t = temps d'écoulement en secondes

K = constante du tube utilisé.

La viscosité du mélange exprimée en centipoises (η_m) étant alors :

$$\eta_m = Kdt \times 100$$

$$\text{et la viscosité spécifique } \eta_{sp} = \frac{Kdt \times 100 - 1}{0,8}$$

$$\eta_s = 0,8 \text{ pour l'eau à } 30^\circ \text{ C.}$$

d) Préparation de l'extrait :

Des graines d'orge traitées et non-traitées aux Ultra-sons furent pesées et broyées dans un moulin à main.

La mouture ne fut pas passée au tamis afin de pouvoir faire l'extrait enzymatique de la totalité des constituants des graines. Etant donné que les déterminations de viscosité, aux intervalles

de temps indiqués plus haut, peuvent être faites en n'utilisant que 5 ml de mélange (substrat-extrait), la quantité d'orge mise en œuvre dans chaque expérience est réduite, si nécessaire, à 3,75 g. Comme chaque traitement par les Ultra-sons ne peut s'effectuer que sur de très petits lots (environ 10 g) une telle modification présente un gros avantage.

La quantité de NaCl (0,1 M.) utilisée pour l'extraction était toujours proportionnelle à celle indiquée dans la méthode originale : 100 g de solution pour 15 g d'orge.

La quantité de mouture nécessaire à l'analyse est introduite dans un tube à centrifugation, puis le liquide nécessaire à l'extraction est ajouté ; l'extraction est réalisée en agitant mécaniquement, à la température du laboratoire (20-22° C) pendant une heure.

Après l'agitation, l'extrait est centrifugé pendant 5 minutes à 4000 tours-minute et filtré. Une centrifugation plus poussée serait peut-être préférable.

e) Détermination de l'activité :

20 g de substrat (préparé d'après les proportions de la méthode originale) sont posés dans un flacon Erlenmeyer et mis à 30° C dans un bain-marie.

20 g d'extrait dilué sont pesés et portés à 30° C de la même manière. Nos extraits étant très actifs, une grande partie des dilutions ont été faites dans les proportions de

15 g extrait pour 5 g NaCl (0,1 M.)

ou suivant les suggestions du Dr ENEBO, de 10 g d'extrait pour 10 g NaCl (0,1 M.).

Le viscosimètre d'OSTWALD est disposé dans un bain-marie réglé par un thermostat, à 30° C $\pm$ 0,05. La partie inférieure du viscosimètre se trouve dans un petit tube à essais, dans lequel, pour chaque détermination de viscosité, 5 ml du mélange (extrait-substrat) sont introduits.

Viscosimètre et tube à essais sont soigneusement lavés et séchés entre chaque détermination.

A chaque détermination de viscosité, le liquide, pour éviter les erreurs possibles, est aspiré dans le viscosimètre.

En dehors des modifications indiquées, les prescriptions de la méthode originale ont été rigoureusement suivies.

B) RÉSULTATS FOURNIS PAR LA MÉTHODE ENEBO MODIFIÉE :

Exemple I. — Orge « Rika » - non traitée

Extrait : préparé avec 7,5 g d'Orge broyé + 50 g NaCl 0,6 p. 100

Mélange Substrat 20 g (Modocoll M ; $C_s = 11$ (concentration)
20 minutes Extrait 15 g + 5 g NaCl (0,1 M)

Constante du viscosimètre utilisé : $K = 0,00138$.

$d = 1,0039$; $Kd : 0,0014$

$\eta_m = Kdt \times 100$ (en centipoises) ; $\eta_{sp} = \frac{\eta_m}{c_s} - 1$

$\eta = 0,8$ pour H_2O à $30^\circ C$

$g = 7,5$; $a = 15$; $V = 13,5$; $c_s = 11$; $NaCl = 50$

Instant des prélèvements en h.	Durées d'écoulement en secondes			η_m (centipoise)			η_{sp}			$\frac{1}{\eta_{sp}}$		
0	75,7	73,5	71,5	10,60	10,30	11,95	12,25	11,85	11,45	0,0815	0,0845	0,0875
0,75	69	67	64,5	9,65	9,38	9,05	11,10	10,70	10,40	0,0900	0,0935	0,0970
1,50	63,2	61,5	59,5	8,80	8,60	8,35	10,10	9,70	9,40	0,0995	0,1030	0,1065

Si on porte les valeurs de $\frac{1}{\eta_{sp}}$ en ordonnées sur un graphique, les temps t étant portés en abscisses, on obtient des droites parallèles. La valeur de $\frac{d}{dt} \frac{1}{\eta_{sp}}$ peut alors être obtenue par interpolation en prenant $t = 1$ heure.

$$d \frac{1}{\eta_{sp}} = \frac{0,0970 - 0,0845}{1,0} = 0,0125 \text{ ou } \frac{0,0995 - 0,0870}{1,0} = 0,0125$$

$$A = \frac{5000 + 7,5 \times 13,5}{7,5 \times 15 \times 10} \times \frac{100}{100-13,5} \times 11^2 \times 0,0125 \times 10 = 4,56 \times 1,15 \times 121 \times 0,0125 \times 10 = 79,5$$

Comme les quantités de substrat et de mouture d'orge utilisées étaient dix fois moindres que celles indiquées dans la méthode originale, nous avons, pour que nos chiffres demeurent comparables à ceux fournis par cette dernière, multiplié le dénominateur par 10.

En vue d'avoir une idée plus complète de la question, nous donnerons plusieurs exemplaires des résultats obtenus avec de l'orge traitée et non-traitée pour diverses dilutions de l'extrait ainsi que pour différentes dimensions de viscosimètres.

Ces différences de viscosité que l'on observe avec ou sans enzyme, en fonction du diamètre du tube viscosimètre et de la répétition des mesures (la viscosité du mélange mesurée après repos étant plus grande que celle mesurée après un premier écou-

lement) sont vraisemblablement dues à des modifications dans la position des chaînes macromoléculaires, pendant l'écoulement ou après agitation. Nous n'insisterons pas sur ces phénomènes qui sont en dehors du domaine de nos recherches actuelles.

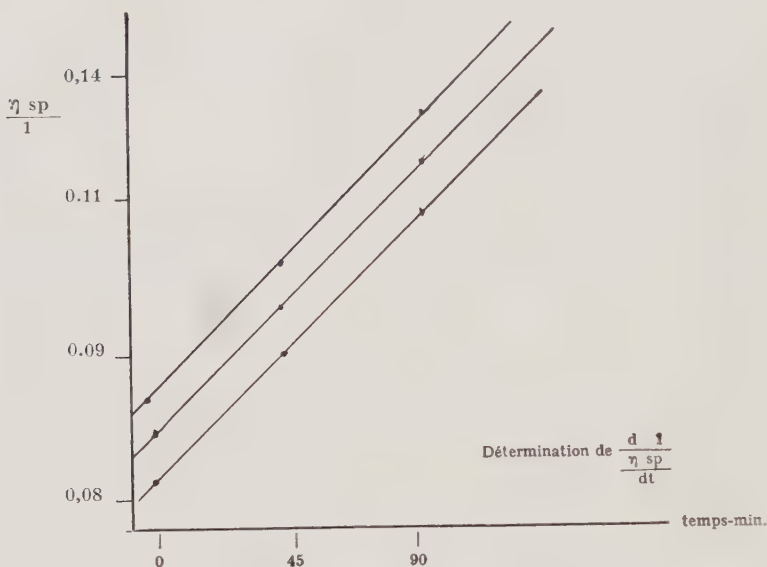


Fig. 7. — Détermination du changement de la viscosité dans le temps.

C — OBSERVATIONS :

Il serait trop long de présenter de nouvelles courbes et d'autres calculs. Un examen attentif des résultats montre qu'en utilisant du Modocoll comme substrat il est plus avantageux d'augmenter la concentration du substrat dans le cas d'extraits très actifs.

Quand on utilise des viscosimètres d'OSTWALD pour les déterminations de viscosité avec du substrat artificiel (Ethyl-hydroxy-éthyl-cellulose), il est préférable de choisir un appareil ayant une constante « K » voisine de celle indiquée dans la méthode originale.

La concentration du substrat et la dilution de l'extrait peuvent toujours être choisies parmi les mieux adaptées à l'expérience en cours.

Quand on utilise, pour les calculs d'activité, la formule de HULTIN [61, 62] en opérant sur de petites quantités de mouture (farine) pour des dilutions assez fortes de l'extrait enzymatique, il est préférable de multiplier le dénominateur avec un facteur

Echantillon Orgé « Rika »	Quantités d'extract et de sol. NaCl 0,6 p. 100 ajoutés à 20 g de sub- trat (Cs = 11).	Constante du visco- simètre x densité (K.d.)	1 Après un temps de (en heures)				Valeur de $\frac{d\eta}{dt}$	Activité A' selon formule (2)
			$\frac{\eta}{sp}$	0	0,5	0,75	1	1,5
Non traitée	Extrait : 15 g Sol. NaCl : 5 g.	0,0014		0,0765 0,0790	0,0825 0,0855		0,0880 0,0915	
d°	d°	0,0017		0,0850 0,0870		0,0945 0,0960		0,1040 0,1060
Traitement aux U.S. à 960 kHz 5 min.	d°	0,0017		0,0840 0,0855		0,0940 0,0965		0,1045 0,1080
10 minutes	d°	0,0017		0,0940	0,1060			0,1200
15 minutes	d°	0,0017		0,0855		0,0990		0,1110
Non traité	Extrait : 10 g. Sol. NaCl : 10 g.			0,100 0,1042 0,1070	0,1134 0,1183 0,1203		0,1290 0,1315 0,1330	
Traitement aux U.S. 5 minutes	d°	0,00083		0,1011 0,1056 0,1060	0,1175 0,1200 0,1235		0,1305 0,1330 0,1350	
							0,027	142

Nota : En utilisant un viscosimètre à temps d'écoulement plus long et en diluant l'extract, le chiffre trouvé pour l'activité augmentée mais l'écart entre l'activité de l'orgé traitée et non-traitée aux Ultra-sons subsiste.

permettant d'obtenir des chiffres comparables à ceux de la méthode originale (voir exemples).

Tous les résultats des analyses enzymatiques seront discutés plus loin, eu égard à leur interdépendance très probable.

3. MESURES DE L'ACTIVITÉ DES ENZYMES SUR UN SUBSTRAT NATUREL (bêta-glucosane).

Etant donné que la méthode qui vient d'être décrite repose sur l'action de l'enzyme sur un substrat artificiel, il nous avait paru intéressant de la comparer à celle due au Professeur PREECE de Heriot-Watt College, Edimbourg [90, 91].

Rappelons que, dans cette méthode, l'extrait d'enzyme est celui indiqué par le Dr ENEBO, mais le substrat utilisé est du bêta-glucosane préparé par fractionnement et précipitation de mouture d'orge.

Le bêta-glucosane contenant deux liaisons bêta-glucosidiques 1,3 et 1,4 en proportions égales, il n'est pas strictement comparable à la cellulose soluble (*communication personnelle du Dr PREECE*).

Le temps nous a manqué pour appliquer nous-même cette méthode et la comparer à celle du Dr ENEBO modifiée par nous. Nous le regrettons et nous réservons de reprendre ultérieurement ce travail.

DISCUSSION

Les résultats obtenus avec l'alpha-amylase et la cellulase montrent que, dans certaines conditions de durée et de fréquence, les Ultra-sons provoquent une augmentation de l'activité enzymatique.

Nos expériences ne nous permettent pas de déterminer si ce phénomène est dû à une formation de nouvelles quantités d'enzymes ou à un accroissement de l'activité de ceux déjà existants.

De plus, l'activation observée, ainsi que la plus grande affinité pour l'eau des grains, peuvent être attribuées soit à une action chimique des Ultra-sons, une oxydation (GRABAR-PRUDHOMME) qui modifierait les groupements actifs des enzymes ou provoquerait des scissions des « molécules » de ces enzymes considérés comme substances macromoléculaires naturelles (STAUDINGER); soit à une action mécanique des Ultra-sons provoquant une rupture des chaînes (SCHMID).

Il ne nous est pas possible de déterminer, d'après nos essais, si les groupements actifs des enzymes ont été modifiés ou non. Quant aux phénomènes de scission, il est vraisemblable de penser qu'ils se produisent par l'un ou l'autre mécanisme, ou par les deux.

Il peut ainsi se faire une dépolymérisation et même, dans certains cas, une nouvelle polymérisation.

Dès qu'une rupture se produit, des radicaux avec leurs électrons sont libérés, permettant un regroupement ou une recombinaison.

En plus, il est important de rappeler que toutes les cellules ne sont pas homogènes. Elles contiennent un cytoplasme visco-élastique constitué d'une diversité de macro-molécules présentant des interfaces communes, ainsi que des noyaux, des vacuoles, etc., dont les propriétés structurales diffèrent de celle du cytoplasme.

Il est donc compréhensible que chaque force de rupture agissant sur cet ensemble complexe puisse causer de profonds changements physiologiques.

Les traitements les plus actifs aux Ultra-sons effectués par nous ont été de courte durée. Ceci coïncide avec les travaux de HENGLEIN (1954), NOMOTO et OKUI (1948) et RUST (1952) cité par HENGLEIN, qui montrent que les plus grands changements du poids moléculaire se produisent durant une irradiation ultrasonore courte, tandis que les produits obtenus par une irradiation prolongée (> 15 minutes) ne diffèrent que très peu dans leur degré de polymérisation.

Ces chercheurs considèrent que l'action se déclenche au-dessus d'une intensité minima. L'augmentation de l'efficacité croît d'abord presque d'une façon linéaire avec l'intensité, pour décroître ensuite quand l'intensité devient trop forte. Il semble que le pH optimum le plus favorable pour l'action dépolymérisante des Ultra-sons soit de l'ordre de pH-5. Or, c'est la zone de pH des suspensions des grains de céréales et c'est également dans cette région que nous avons effectué nos études sur l'activation de la cellulase.

Toutes ces analyses nous incitent à penser que l'action des Ultra-sons sur les activités enzymatiques doit être, au moins pour une part, en relation avec des phénomènes de dépolymérisation et de regroupement des molécules biologiques (enzymes, substrats ou effecteurs d'enzymes).

CHAPITRE IV

*Étude de l'action des ultra-sons
sur le développement de la vanilline
dans la préparation de la vanille.*1^o GÉNÉRALITÉS

Les études enzymatiques précédentes montrent tout l'intérêt que présenterait un travail relatif à l'action possible des Ultra-sons sur la vanille. Nos connaissances sur les parfums permettent d'attribuer la formation de la vanilline et d'autres composés odorants participant à l'arome de la vanille, à des diastases oxydantes et hydrolysantes ; aussi parut-il intéressant d'essayer un nouveau moyen d'action favorisant les actions diastasiques. D'après JANOT (Recherches inédites), la vanilline et le parfum, absents dans le fruit vert de la vanille, se forment pendant la maturation naturelle ou artificielle. Ceci a orienté les chercheurs vers des réactions enzymatiques, pour tâcher de reconnaître la nature des réactions physico-chimiques et biologiques donnant lieu à la production de l'arome.

L'élaboration d'une fermentation dans la vanille après la récolte a déjà été signalée, il y a deux siècles, par MILLER [79], et en effet, c'est dans ce domaine des actions fermentaires que les résultats acquis de nos jours présentent une certaine valeur.

La reproduction de tous les nouveaux travaux concernant la formation du parfum de la vanille ne constituant pas l'objet de cette étude, nous nous abstenons de l'entreprendre ici, mais, avant d'aborder l'étude de l'augmentation de la quantité de la vanilline obtenue par le traitement aux Ultra-sons, il est intéressant de rappeler les systèmes enzymatiques entrant en jeu dans la genèse de celle-ci.

Le parfum de la vanille, dégagé après la préparation ou durant l'étiolage (ainsi que le changement de couleur), est dû, d'après JANOT [64], à un système enzymatique : hydrolase (non identifiée), oxydase (désoxyhydrogénase), peroxydase, catalase, etc. BOURRIQUET [13] cite des travaux d'ARANA [3, 4, 5, 6] permettant d'attribuer ce processus à des diastases oxydantes et hydrolysantes du type bêta-glucosidase.

Étant donné qu'une augmentation d'activité de l'amylase et de la cellulase par les Ultra-sons a pu être démontrée, une certaine corrélation de ces actions avec celles produites dans les gousses de vanille serait possible. C'est pourquoi des gousses vertes de

vanille provenant de la région d'Antalaha (Madagascar) et transportées par avion à Paris, ont été soumises à l'action des Ultra-sons de diverses fréquences et de temps variés. Un tel traitement présentait un certain intérêt puisque, outre les méthodes courantes d'échaudage, divers essais par action des rayons infra-rouges ou ultra-violet, du froid, des antiseptiques, etc. avaient été effectués à Madagascar et d'autres régions productrices de vanille.

Dans les essais présentés ci-dessous, nous nous sommes efforcés de nous placer autant que possible dans les conditions extérieures naturelles (température, etc.) et d'adopter la propre technique utilisée à Madagascar.

2° TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

De la vanille verte en gousses entières ou en « cuts » a été traitée par des Ultra-sons dans des cuves à eau avec générateur à quartz, à diverses fréquences contrôlées de 290, 570 et 983 kHz ; les puissances acoustiques développées variant de 2,5 à 5,5 W/cm².

Les « cuts » étant des gousses coupées en tronçons, ceci représente une nouvelle méthode de préparation de la vanille permettant de simplifier certaines opérations. Du point de vue du traitement, les « cuts » sont plus facilement brassés et maintenus dans le faisceau ultrasonore. Contrairement aux méthodes courantes, toute une série de traitements fut faite avec des vanilles entières et en ballots, l'égrappage habituel n'ayant pas été effectué de manière à faciliter la manipulation.

Pour les traitements aux températures élevées, l'eau fut préalablement chauffée puis introduite dans la cuve au-dessus du quartz et la température maintenue par un système de chauffage électrique.

Dans les tableaux qui suivent, nous présentons les détails des traitements ainsi que quelques observations sur le développement du parfum.

Tous les traitements indiqués ci-dessus ont été effectués au Centre d'Etude et de Recherches pour les Applications Industrielles des Ultra-sons, à Paris, et les analyses faites par le Centre Technique d'Agriculture Tropicale à Nogent-sur-Marne.

3° RÉSULTATS OBTENUS

Ils sont rassemblés dans les deux tableaux ci-après :

4° INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une étude attentive des pourcentages de vanilline par rapport à la matière sèche (voir tableau d'analyse) nous montre

Analyse de la Vanille de Madagascar traitée aux Ultra-sons.

Traitements	Pourcentage d'humidité	Pourcentage d'extract sec par rapport à la matière sèche	Pourcentage d'azote par rapport à la matière sèche
SÉRIE 1 gousses			
290 kHz	1	30,49	10,75
2,5 W/cm ²	2	21,46	9,61
	3	26,23	9,54
SÉRIE 2 « cuts »			
290 kHz	1	20,01	4,80
2,5 W/cm ²	2	22,65	5,31
	3	24,77	4,88
	4	26,97	6,12
SÉRIE 3 gousses			
983 kHz	1	35,19	9,87
5,5 W/cm ²	2	33,74	8,30
	3	27,15	13,65
SÉRIE 4 « cuts »			
983 kHz	1	38,33	5,09
5,5 W/cm ²	2	31,97	6,73
	3	36,33	8,60
SÉRIE 5 « cuts »			
580 kHz	1	40,26	7,93
2,8 W/cm ²	2	33,47	9,73
	3	38,31	8,25

que, dans tous les cas, un traitement aux Ultra-sons augmente la quantité de vanilline produite. Les traitements prolongés dans un bain d'eau à 25° C, température voisine des conditions ambiantes de Madagascar, ayant donné des quantités de vanilline supérieures à celles du témoin, ceci nous incite à penser que cette méthode, convenablement améliorée, pourrait être appliquée pratiquement car elle évite le chauffage de l'eau. Le fait qu'une augmentation du taux de vanilline ait été observée après un traitement dans l'eau à température relativement basse vient à l'appui de l'assertion que l'action des Ultra-sons est due plutôt à un effet biochimique qu'à un effet thermique.

D'autre part, le taux réduit d'humidité et d'azote de la majorité des lots traités, confirme les données présentées à ce sujet par divers chercheurs, SPENCER (U.S.A.), KAIBARA (Japon et BJEDL (Autriche).

Le fait que le pourcentage d'extract sec par rapport à la matière sèche est plus faible pour les produits traités, pourrait être attribué à un réarrangement des particules encore visible

Analyse de la Vanilline.

Traitements	Pourcentage de vanilline par rapport à la matière sèche	Détail du traitement
SÉRIE 1 gousse		
Fréquence	1 3,2	Non traitée 3' t° de l'eau : 63°C
290 kHz	2 3,8	Ultra-sons 2' — 50°C
	3 3,95	— 10' — 25°C
SÉRIE 2 « cuts »		
Fréquence	1 3,35	Non traités 3' t° de l'eau : 63°C
290 kHz	2 4,4	Ultra-sons 2'30 — 48-51°C
	3 3,6	— 10' — 25-27°C
	4 3,8	— 10' — 25-28°C
SÉRIE 3 gousses		
Fréquence	1 4,5	Ultra-sons 10' t° de l'eau : 25-28°C
583 kHz	2 4,3	— 3' — 49-50°C
	3 3,25	Non traitées 3' — 63°C
SÉRIE 4 « cuts »		
Fréquence	1 3,4	Non traitée 3' t° de l'eau : 63°C
983 kHz	2 4,0	Ultra-sons 10' — 25°C const.
	3 4,5	— 2' — 44-50°C
SERIE 5 « cuts »		
Fréquence	1 3,3	Non traités 3' t° de l'eau : 63°C
580 kHz	2 4,4	Ultra-sons 2' — 50°C const.
	3 3,85	— 10' — 25°C

au microscope électronique, ainsi qu'à l'effet activant des ondes ultrasonores sur les systèmes enzymatiques dissolvant les parois cellulaires et permettant d'obtenir un extrait plus concentré (*voir activation de la cellulase, déshydratation et dépolymérisation*).

N'étant pas biochimiste, il m'est difficile de commenter les résultats relatifs au pourcentage d'azote par rapport à la matière sèche, mais ces résultats nous permettent de penser que, sous l'effet du traitement, une transformation de matière assez importante a dû se produire.

En particulier, le *lot 3* de la *série 2* a subi un second traitement 24 heures après le premier, et le pourcentage d'azote de ce *lot* est sensiblement inférieur à celui du *lot 4* de la *série 2* traité de la même manière, sauf le traitement supplémentaire ; ce résultat semble étayer cette théorie.

D'autre part, pour avoir une idée de l'intérêt économique de la question, nous donnerons, en aperçu, des chiffres d'exportations et de consommations des différents pays pendant une année normale. :

Exportation :

Madagascar	400 tonnes
Tahiti	100 »
Les Comores	100 »
Mexique	100 »
La Réunion	50 »
Nossi-Bé	35 »
Guadeloupe	12 »
Divers	40 »

et Consommation mondiale (avant 1939) :

Etats-Unis	500 tonnes
Europe	300 »
Autres Pays	50 »

Une augmentation des taux de Vanilline obtenus par un traitement ultrasonore pourrait être d'une importance économique considérable.

Enfin, la possibilité d'une corrélation entre les résultats sur l'activité enzymatique obtenus par le traitement aux U.S., de l'amylase et de la cellulase, et ceux observés sur des vanilles traitées, nous conduit à penser que le système enzymatique des surfaces des cellules (cell surface enzymes) pourrait jouer un rôle prépondérant.

DISCUSSION

L'augmentation de vanilline obtenue, après un traitement de la gousse verte par les Ultra-sons, doit être attribuée vraisemblablement à une augmentation de l'activité enzymatique et se trouver ainsi étroitement liée aux résultats et effets décrits sur l'alpha-amylase et la cellulase dans le chapitre précédent.

En plus, cette action peut être reliée, d'après la théorie de VIRTANEN [116, 117], à l'action des enzymes en biologie. Suivant VIRTANEN, les protéines d'une cellule se composent des protéines d'enzymes spécifiques et chaque molécule de protéines dans la cellule représente un centre d'énergie réactionnelle. En supposant que les différentes molécules des enzymes se trouvent groupées dans différentes couches (zones) de la cellule, l'assimilation des divers produits nutritifs apparaît plus compréhensible.

Dans la couche extérieure des cellules se trouvent des enzymes effectuant l'hydrolyse des éléments nutritifs, à poids moléculaire élevé. Les enzymes de la zone suivante dégradent les produits provenant de la transformation de la zone précédente, etc.

Ainsi, la pénétration des éléments nutritifs dans la cellule pourrait être considérée comme un événement purement chimique, étant étroitement associé à l'action des enzymes. La perméabilité pourrait ainsi être considérée comme une suite de processus chimiques.

L'harmonie admirable qui existe parmi les différentes réactions d'une cellule, étant d'une importance primordiale pour la vie, est due probablement à la structure fine de la cellule (voir FRY-WYSSLING) et à la distribution des enzymes dans celle-ci.

Les enzymes des grains ainsi que des spores au repos ne montrent qu'une activité très faible; ceci laisse supposer que les protéines des grains et des spores sont peu actives du point de vue enzymatique. D'autre part, la germination est caractérisée par une production rapide de divers enzymes actifs, qui déclenchent cette action.

Les résultats de nos expériences coïncident avec cette hypothèse et montrent que les ultra-sons déterminent des processus de réactions en chaîne, ce qui expliquerait l'augmentation du taux de vanilline dans les gousses traitées, ainsi que l'interaction entre l'amylase et la cellulase.

CHAPITRE V

Discussion et Conclusion générale.

Les résultats obtenus et présentés ci-dessus incitent à certaines réflexions. Dans des conditions expérimentales convenables, l'action des Ultra-sons sur les grains d'orge s'est traduite par une accélération de la germination et du métabolisme.

La microcalorimétrie, grâce à l'emploi d'un appareil aussi précis que le microcalorimètre du Professeur CALVET a confirmé ces données. Les thermogrammes obtenus par l'enregistrement des débits thermiques des grains traités dans leur partie physico-chimique ont indiqué l'existence de processus biochimiques.

C'est pourquoi notre travail s'est orienté vers l'étude de l'action enzymatique. La mesure de l'activité de l'alpha-amylase et de la cellulase, ainsi qu'une analyse des gousses de vanille soumises à l'action des ondes ultrasonores ont confirmé l'action activante de ces traitements et montré que les Ultra-sons provoquent une accélération de certaines fonctions enzymatiques.

Un examen rétrospectif de l'ensemble des résultats, nous conduit à la conclusion qu'il existe une corrélation entre les phénomènes observés.

A l'appui de cette théorie nous avons présenté plusieurs exemples mettant en évidence une interdépendance possible des divers facteurs: ainsi l'analyse de la cellulase a montré que les Ultra-sons provoquent une augmentation d'activité de cet enzyme hydrolysant les parois cellulaires.

Cette hydrolyse accélérée déclenche, en dehors d'une pénétration d'eau plus rapide, d'autres processus enzymatiques, parmi lesquels la dextrinisation de l'amidon par les amylases se traduisant finalement par une production de sucre.

Si, d'autre part, on prend en considération que l'activité de la cellulase est stimulée par certains sucres (glucose, mannose, xylose) — l'effet du glucose étant particulièrement important — une corrélation entre ces divers effets mécaniques et chimiques peut être envisagée :

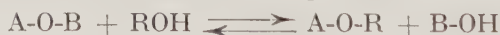
— perméabilité des membranes $\longleftrightarrow$ dégradation des parois cellulaires $\longleftrightarrow$ dépolymérisation de l'amidon $\longrightarrow$ développement plus actif de l'embryon.

Le mécanisme de l'activation de la cellulase purifiée par le glucose pourrait être expliqué par la théorie récente admettant que la cellulase se compose de deux enzymes.

L'un d'eux est un enzyme typiquement hydrolytique « bêta-polyglucosidase » et l'autre un enzyme non hydrolytique « transglucosidase » qui, pour être actif, a besoin d'un sucre, comme par exemple le glucose.

Un plus grand nombre de preuves seraient nécessaires pour démontrer cette théorie mais il est probable qu'une *transglucosidase* (1) agit sur les bêta-polysaccharides, durant la germination de l'orge.

Comme, d'autre part, la formation de la vanilline est liée à l'action de la bêta-glucosidase, ce fait pourrait bien expliquer les résultats obtenus concernant une accélération de la germination et de la croissance comme ceux relatifs à l'élévation du taux de vanilline après le traitement. Si un sucre réducteur ROH réagit avec un polysaccharide A-O-B, un transfert du lien glucosidique d'un radical B vers un autre R se produit :



cette réaction pouvant être réversible.

En plus, une action probable des Ultra-sons sur les enzymes des surfaces cellulaires (*cell surface enzymes*) serait possible. Comme la surface d'une cellule participe activement à de multiples fonctions cellulaires et joue un rôle important dans de nombreuses interactions entre la cellule vivante et le milieu environnant, la réalité d'une activation de ce système enzymatique est plus que probable.

Le but de cette discussion n'est pas d'approfondir les problèmes liés à l'action générale de ces enzymes, mais de mettre

(1) Le terme « transglucosidase » est utilisé d'après la définition de DOUNDORF.

spécialement en évidence le rôle que ces enzymes pourraient avoir joué dans l'étude présentée.

D'autre part, grâce à des recherches poursuivies dans ce domaine pendant ces dernières années (ALTMANN K. J. observation non publiée), on a pu constater que la surface des cellules possède des enzymes régularisant le transport de diverses substances à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Une activation de ce groupe d'enzymes [2, 15, 16, 36, 96] expliquerait la diffusion plus rapide de ces substances.

En résumé, nous avons pu mettre en évidence les effets suivants de l'action des Ultra-sons :

- a) accélération de la germination ;
- b) activation du métabolisme ;
- c) modification de la facilité d'absorption ;
- d) diffusion des substances intra et extra cellulaires.

Et, effectivement, dans nos conditions de travail, en utilisant comme critères la teneur en eau, les poids frais et sec des plantules, l'accélération du métabolisme mesurée par le P^{32} , les mesures calorimétriques de la respiration, ainsi que l'activation de certains processus enzymatiques, *l'action des Ultra-sons* s'est toujours traduite par un effet positif très notable.

Toutefois, cette activation peut parfois être ralentie sous l'effet de lésions importantes provoquées par des traitements de trop longue durée, ou des surdosages produisant des destructions traumatiques de la structure cellulaire.

En outre des structures fibreuses extra-cellulaires, c'est le protoplasma cellulaire lui-même qui, du point de vue structural et fonctionnel, est influencé par les Ultra-sons.

L'ensemble de ces résultats conduit à penser que des effets mécaniques et bio-chimiques très profonds se produisent à la suite du traitement et que leur influence se manifeste par une stimulation générale de la croissance.

Toutefois, l'activation observée sur l'alpha-amylase et la cellulase, ainsi que la plus grande affinité pour l'eau des grains, incitent à penser que ces phénomènes peuvent encore être attribués soit à une action chimique des Ultra-sons, soit à une oxydation (GRABAR-PRUDHOMME), qui modifierait les groupements actifs des enzymes ou provoquerait des scissions des « molécules » des enzymes, considérées comme substances macromoléculaires naturelles (STAUDINGER). En plus, le gonflement des substances colloïdales, dû à une solvation plus rapide, pourrait partiellement expliquer la modification de la perméabilité des grains. D'autre part, l'augmentation des taux de vanilline obtenus après un traitement est vraisemblablement due à l'activité enzymatique, et est aussi étroitement liée aux processus décrits ci-dessus.

En plus, il est important de rappeler que les cellules de tout être vivant ne sont pas homogènes. Elles contiennent un cytoplasme visco-élastique formé d'une diversité de macromolécules présentant des interfaces communes, ainsi que des noyaux, des vacuoles, etc... dont les propriétés structurales, diffèrent de celles du cytoplasme.

Il est donc compréhensible que chaque force de rupture agissant sur cet ensemble complexe puisse causer de profonds changements physiologiques.

Comme, dans nos expériences, les irradiations ultra-sonores les plus actives ont été de courte durée, les résultats obtenus coïncident avec les travaux de HENGLEIN, NOMOTO, RUST, etc. qui montrent que le plus grand changement du poids moléculaire se produit durant une ultrasonation courte, tandis que les produits d'une irradiation prolongée > 15 minutes ne varient que très peu dans leur degré de polymérisation.

Il semble que l'action des Ultra-sons se déclenche au-dessus d'une intensité minima.

L'efficacité de cette action croît d'abord presque d'une façon linéaire avec l'intensité, pour décroître ensuite quand l'intensité devient trop forte.

Remarquons encore que le pH optimum pour une action dépolymérisante des Ultra-sons est de l'ordre de pH5. Or, c'est la zone de pH des suspensions des grains de céréales et c'est également dans cette région que nos études sur l'activité de la cellulase furent effectuées.

Toutes ces observations incitent à penser que l'action des Ultra-sons sur les activités enzymatiques doit être, au moins pour une part, en relation avec des phénomènes de dépolymérisation et de regroupement des molécules biologiques (enzymes, substrats ou pro-enzymes.)

Cela nous ramène aux travaux de Sir Cyril HINSHELWOOD, prix Nobel de Chimie (1956) qui a clarifié la notion d'énergie d'activation. Sir Cyril HINSHELWOOD démontre que les molécules peuvent réagir entre elles à condition qu'elles aient acquis une certaine énergie minimum qu'on leur communique par *chauffage*, *excitation lumineuse*, etc. Dès lors, elles deviennent actives et peuvent, par choc, donner des réactions chimiques.

Tout récemment Sir Cyril HINSHELWOOD a montré que ses théories s'appliquaient aussi à la biologie, en particulier à la croissance des bactéries, domaine qu'il exploite maintenant.

Ceci nous incite à penser qu'il serait intéressant de continuer nos travaux dans cette voie, afin d'apporter de nouveaux arguments à nos hypothèses et à nos conclusions sur le mécanisme d'action d'une source d'énergie activante telle que les Ultrasons.

On peut, dès à présent, entrevoir de multiples possibilités d'application pratique des traitements aux Ultra-sons.

Toutefois, de nombreuses recherches sont encore nécessaires pour préciser le détail des phénomènes, travaux qui ouvriront, peut-être, de nouvelles perspectives.

REMARQUE. — Nous poursuivons, actuellement, au Laboratoire du Professeur OBERLING, du Collège de France à Paris, en nous aidant du microscope électronique, l'étude des modifications qui seraient produites à une échelle submicroscopique, par les Ultra-sons, sur l'embryon et l'endosperme d'une graine. A la suite des conseils et encouragements que nous avons reçus de plusieurs côtés, nous envisageons d'étudier, dans un proche avenir, les effets des ondes ultrasonores sur l'enzyme désoxyribonucléase dans les graines de céréales, travail qui, à notre connaissance, n'a encore été jamais entrepris.

RÉSUMÉ

Au cours d'une étude expérimentale des propriétés stimulatrices des vibrations ultra-sonores, on a pu montrer que des graines d'orge traitées germaient plus vite et se développaient plus rapidement que les plantules provenant des graines non traitées.

Toutes nos expériences ont été entreprises en vue d'élucider, à l'aide de différentes méthodes, la relation existant entre de tels traitements et l'accélération de la germination et de la croissance.

Des graines d'orge « *Rika* » et « *Fréja* » ont été traitées dans de l'eau par des vibrations ultrasonores pendant 5, 10, 15, 20 et 25 minutes, les fréquences utilisées étant de l'ordre de 23 à 960 kHz et les puissances de 1-6 w/cm².

I. — Dans un premier groupe d'expériences nous avons pu montrer que :

a) Le traitement provoque une accélération de la germination et de la faculté germinative. Les plantules issues de graines traitées se développent plus vite.

b) La teneur en eau des graines traitées est plus forte que celle des témoins immergés pendant le même temps.

c) Avec le P³², on a pu mettre en évidence le fait que l'accélération de la germination reste acquise dans la plantule pendant un certain temps après l'action des Ultra-sons sur les graines.

d) Les plantules provenant des graines traitées ont des teneurs en matière sèche et en cendres plus élevées que les plantules témoins.

II. — Par des mesures effectuées à l'aide du microcalorimètre CALVET, on a comparé les courbes représentant la ciné-

tique de la thermogénèse dans le cas des graines traitées et non-traitées par les Ultra-sons.

Ces courbes ont montré que la durée de la thermogénèse physico-chimique, caractérisée par la première pointe exothermique, est diminuée dans le cas des graines traitées et que le phénomène passe alors rapidement de la phase physico-chimique à la phase de thermogénèse biologique, cette deuxième phase pouvant même se superposer à la phase physico-chimique. Ainsi les traitements provoquent une accélération de la germination et modifient favorablement la durée de celle-ci (thermogénèse biologique plus active).

III. — Les analyses enzymatiques de l'alpha-amylase et de la cellulase ont mis en évidence l'effet activant des traitements sur ces enzymes.

Ceci confirme les résultats microcalorimétriques qui ont déjà montré que la facilité d'absorption de l'eau dans les graines, ainsi que les processus enzymologiques produisant la thermogénèse biologique, sont nettement accélérés par les Ultra-sons.

Le phénomène d'accélération de l'activité enzymatique prouve qu'en plus d'une augmentation de la perméabilité des membranes, il vient s'y associer des actions dépolymérisantes (dépolymérisation de l'amidon par l'amylase), qui expliquent, mieux que la seule absorption d'eau, la prolongation dans le temps de l'effet des Ultra-sons sur les graines se manifestant par l'accélération de la croissance.

IV. — Le traitement de la vanille verte, en gousses entières ou en « cuts », ayant donné des taux de vanilline supérieurs à ceux des témoins, ce fait montre lui aussi la profondeur de l'action existante des Ultra-sons sur divers systèmes d'un organisme vivant.

* * *

Comme les phénomènes d'accélération de la germination et d'autres effets biologiques se manifestent plusieurs semaines, ou plusieurs mois après le traitement, on peut penser que des variétés de céréales les plus précoces pour lesquelles un perfectionnement génétique est difficile à obtenir, pourraient être avantageusement traitées par les vibrations ultrasonores.

* * *

Mais le traitement d'un corps ou d'un organisme avec ses effets physiologiques complexes, doit se faire en tenant compte du fait que ce ne sont pas seulement les ondes sonores simples qui agissent, mais un système complexe d'énergie avec toutes ses forces très variables.

*
* * *

Tout ce qui précède nous incite à attirer l'attention sur le fait que des doses Ultra-sonores trop fortes, ainsi que des traitements de trop longue durée, peuvent provoquer des effets mortels ou des lésions irréversibles.

Du point de vue pratique, l'application des Ultra-sons serait avantageusement réalisée dans le cas des cultures intensives ou dans celui des cultures faites dans des régions où les périodes de germination, de développement et de maturation des plantes sont étroitement limitées par des facteurs tels que le froid et la sécheresse.

En conclusion, nous voudrions souligner l'importance que pourraient avoir de tels traitements du point de vue économique et industriel.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER (P.), 1950. — Powerful acoustic waves *Research*, London, 3, 68-73.
2. ALTMANN (K.-J.), 1953. — The in-vitro incorporation of C¹⁴-acetate into the stroma of the erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophysics* 42, 478-480.
3. ARANA (F.-E.), 1943. — Vanilla processing. *Agr. Expt. Stat. Rpt.*, 1942, p. 23-25. Puerto-Rico (Mayaguez).
4. ARANA (F.-E.), 1951. — Action of a β -glucosidase in the curing of vanilla. *Food Res.* N° 8, p. 343-351.
5. ARANA (F.-E.), 1944. — Vanilla curing and its chemistry. *Agr. Expt. Stat. Bull.*, N° 42, p. 17, Puerto-Rico (Mayaguez).
6. ARANA (F.-E.), 1940. — Chemistry of vanilla. *Agr. Expt. Stat. Rpt.*, p. 2-14. Puerto-Rico (Mayaguez).
7. ASCHE (O.), 1951. — Nuclear aberation induced by ultrasound. *Strahlentherapie*, Vol. 85, 2.
8. BERENTS (J.), 1948. — *Untersuchungen über Keimveränderungen an Erbsen (Pisum sativum) durch Ultra-Schall unter besonderer Berücksichtigung der biologischen Abweichungen.* Dissertation, Erlangen, Med. Klinik.
9. BERGMANN (J.), 1949. — *Der Ultraschall u. seine Anwendungen in Wissenschaft u. Technik.* S. Hirzel, Verlag (Stuttgart).
10. BERNSTEIN (L.), 1943 a. — Amylases and carbo-hydrates in developing mize endosperm. *Am. J. of Botany* 30 : 517-526.
11. BERNSTEIN (L.), 1943 b. — Hybrid vigor in corn and the mobilization of endosperm reserves. *Am. J. of Botany* 30 : 801-809.

12. BLOM (J.) and BRAAE (B.), 1936. — Untersuchungen über den enzymatischen Abbau der Stärke. *Z. Physiol. Chemic.* 252 : 261-270.
13. BOURIQUET (G.), 1954. — *Le Vanillier et la Vanille dans le Monde*. Encyclopédie Biologique XLVI.
14. BROOCKS (S.-G.) and BROOCKS (M.-M.), 1941. — *The permeability of living cells*. Protoplasma Monographien 19, Berlin, Zehlendorf Verl.
15. BROWN (R.), 1952. — Protoplast surface enzymes and absorption of sugar. *Int. Rev. Cytology*, I, p. 107-118.
16. BROWN (R.), REUTH (W.-S.) and ROBINSON (E.), 1952. — The mechanism of plant cell growth *Symp. Soc. Biol.* 6, p. 329-347.
17. BUONSANTO (M.), 1950. — Influenza degli Ultra-soni sulla velocità di mutarotazione del alpha-glucose. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 25, p. 878-880.
18. BURKERT (G.-M.) and DICKSON (A.-D.), 1951. — The action of the amylases of two barley varieties on the barley starches. *Cereal Chemistry*, 18, p. 605-615.
19. BUSHNELL (R.-J.) and WALLACE, 1948. — Induction of sex linked mutations in *Drosophila melanogaster* with Ultra-sonic treatment. *Anat. Rec.* 101, p. 690.
20. BUSNEL (R.-G.) et OBOLENSKY (G.), 1954. — Recherches préliminaires sur l'action des Ultra-sons de haute et basse fréquence sur la germination de l'Orge. *Congrès Intern. de Botanique*, Paris (sous presse).
21. BUSNEL (R.-G.) et OBOLENSKY (G.), 1954. — Action des Ultra-sons sur la vitesse de germination et la croissance de l'Orge. *C. R. Ac. Sci. T.* 239, p. 777-779.
22. BUSNEL (R.-G.) et OBOLENSKY (G.), 1955. — Etude microcalorimétrique de l'accélération de la germination des graines traitées aux Ultra-sons. *C. R. Ac. Sci. T.* 240, p. 1358-1360.
23. BUSNEL (R.-G.) et OBOLENSKY (G.), 1955. — Recherches préliminaires sur l'action des Ultra-sons de haute et basse fréquence sur la germination de l'Orge. *Ultra-Schall in Medizin u. Grenzgebieten*, Band 8, Mars, p. 1-11.
24. BUSNEL (R.-G.) et OBOLENSKY (G.), 1954. — Influence de la longueur d'onde Ultra-sonore dans l'action des Ultra-sons sur la germination des graines de céréales. *C. R. Congrès Int. des Ultra-sons*. Marseille.
25. CALVET (E.), 1954. — La microcalorimétrie à compensation par effet Joule et Peltier. Application à l'étude des Phénomènes physico-chimiques et biologiques. *Mémorial des Services chimiques de l'Etat*. T. XXXVIII.
26. CALVET (E.), et PRAT (H.), 1945. — Intérêt des mesures microcalorimétriques pour l'étude de la germination des semences. *Congrès de l'Association Canadienne pour l'avancement des Sciences*. Montréal, Canada.
27. CALVET (E.), et PRAT (H.), 1945. — Sur les éléments des courbes de thermogénèse utilisables pour caractériser l'état et les propriétés spécifiques des semences. *C. R. Ac. Sci. T.* 220, p. 470.
28. CALVET (E.), et PRAT (H.), 1956. — *Microcalorimétrie. Applications Physico-chimiques et Biologiques*. Masson éditeurs, Paris.

29. CARPIO (M.-D.-A.), 1951. — Apportaciones para el estudio de variaciones cromosomicas inducidas par ultrasonidas. *Genetic Iberica*, 3, 113-128.
30. CARPIO (M.-D.-A.) and ORELLANA, 1951. — Apportaciones para el estudio de las variaciones cromosomicas inducidas par ultrasonidas. *Genetic Iberica*, 3, 3-20.
31. CASPERSON, HYDEN, DARLINGTON and KOLLER, 1947. — Nucleic acid. *Symp. Soc. Exp. Biol.* I, Cambridge.
32. CHOUARD (P.), 1949. — Les progrès récents dans la connaissance et l'emploi des substances de croissance. *Rev. Int. Botanique appl. et Agr. trop.* 28, 189-203 et seq. 1948 ; 29 : 138-156 et seq. 1949.
33. CORNELL (V.-R.), 1952. — Starch and Ultra-Sonics. *Food Res.* U.S.A. 17, 81-92.
34. CZAJA (A.-Th.), 1954. — Microscopischer Nachweis von Amylose und Amylopektin am Stärkekorn, sowie zweier Typen von Stärkekörnern. *Pflanze* Bd 43. Heft 5, p. 379-392.
35. CZAJA (A.-Th.), 1954. — Farbphotographische Stärkestudien. *Photographie und Forschung* Bd 6.
36. DANIELLI (J.-F.), 1952. — Structural factors of cell permeability. *Symp. Soc. Exper. Biol.* 6, 1-15.
37. DAVSON (H.) et DANIELLI (J.-F.), 1943. — The permeability of natural membranes. *Univ. Press. Cambridge.*
38. DEMERT (W.), 1950. — *Die Natur des Wunder Gottes*. Athenäum Verlag, Bonn. (p. 128-148).
39. DICKSON (A.-D.), 1943. — A collaborative study of methods for the determination of amylase activity. *Cereal Chemistry* 20, p. 31-35.
40. DOGNON (A.) et BIANCONI (H.), 1937. — *Ultrasons et Biologie*. Gauthier-Villars, éditeur, Paris.
41. DOUNDORF (M.), BACKER (H.) and HASSID (W.), 1947. — *J. Biol. Chem.*, 168, 725.
42. DUBOW (R.-J.), 1949. — Mutagenic effects of ultrasonic vibrations on *Drosophila melanogaster*. *Thesis, Univ. of Connecticut, Storrs (Conn.)*.
43. DURAND (V.), 1953. — Germination comparée du riz dans l'eau et dans l'air humide à différentes températures. *C. R. des Séances Soc. Biol. Marseille*, p. 457.
44. ENEBO (L.), SANDERGREN (E.) and LJIMGDAHL, 1953. — Cell wall decomposing enzymes of barley and malt. *J. of the Inst. of Brewing*, 59, 206-211.
45. FRENZEL—HINSBURG und SCHULTERS, 1935. — Über den Einfluss des Ultraschalls auf Diffusionsvorgänge. *Z. Exp. Medizin*, 96, p. 81-816.
46. FREY-WYSSLING (A.), 1952. — Growth of plant cells. *Symp. Soc. Exper. Biol.* 6, 320-328.
47. FREY-WYSSLING (A.), 1953. — *Submicroscopic morphology of protoplasm*. Elsevier publish. Comp. New-York.
48. FRINGS (M.), ALLEN (L.-M.) and RUDNIK (J.), 1948. — The physical effects of high intensity air borne ultra-sonic waves on animals. *Jour. Cell. Comp. Physiol.*, 31, 329-358.

49. GILLES (E.), 1944. — Les effets fongicides et bactéricides des ondes très courtes sont, dans certaines conditions, la conséquence d'une action thermique élective. *C. R. Soc. Biol.*, 138, 565-567.
50. GLAUSER (O.), 1951. — The effect of ultra-sonics on the growth of the taproot of *Pisum sativum* and seeds of rice and *Panicum*. *Strahlentherapie*. Vol. 85, 3.
51. GOULDEN (H.-C.), 1952. — *Methods of statistical analysis*. J. Willey and Sons Ed., New-York.
52. GRABAR (P.), 1953. — Biological Action of Ultra-sonic Waves. *Adv. in Biol. and Med. Physics*. Vol. III, p. 191-246.
53. GRABAR (P.), et PRUDHOMME (R.-O.), 1947. — Action des Ultra-sons sur les macromolécules. *Jour. Chimie Physique*, 44, 145-153.
54. GRABAR (P.), et PRUDHOMME (R.-O.), 1947. — Dépolymérisation par les Ultra-sons. *Journ. Chimie Physique*, 44, p. 145.
55. HAMES (C.-S.) and CATTLE (M.), 1938. — Starch iodine coloration as an index of differential degradation by amylases. *Proc. Roy. Soc. London*, B, 125, 387-414.
56. HARVEY (N.-E.) and LOOMIS (A.-L.), 1928. — High frequency sound waves of small intensity and their biological effects. *Nature*, 121, 622-624.
57. HEILBRUNN (L.-V.), 1952. — *An outline of general physiology*. W. B. Sander Co, Philadelphia.
58. HENGLEIN (A.), 1954. — Die auflösung ü der Verlauf der Polymerisation des Acrylamids unter dem Einfluss von Ultraschallwellen. *Die Makromolekulare Chemie* Bd XIV, Heft I, p. 15-39.
59. HENGLEIN (A.), 1954. — Die Bildung von graftpolymeren aus Polyacrylamid ü Acrylnitril unter dem Einfluss von Ultraschallwellen. *Die Makromolekulare Chemie*. Vol. XIV, Heft 2/3, p. 129-145.
60. HENGLEIN (A.), 1955. — Die Kombinationen von freien makromolekularen Radikalen, die durch Ultraschallabbau von Polymethacrylsauremethylester ü von Polystyrol gebildet werden. *Die Makromolekulare Chemie* Bd XVIII-XIX, p. 37-47.
61. HULTIN (E.), 1946. — *Swensk Kem. Tidsk.*, 1946, 58, 281.
62. HULTIN (E.), 1949. — *Acta chem. Scand.*, 1949, 3, 625.
63. ISTOMINA (O.) and OSTROWSKY (E.), 1936. — The effect of ultrasonic vibrations on plant development. *Dok. Acad. of Sci. U.R.S.S.*, Vol. II (XI), p. 155-160.
64. JANOT (M.-M.), 1954. — Formation du parfum de la vanille (chap. XIII) dans « *Le Vanillier et la Vanille* ». Encyclopédie Biologique, XLVI.
65. JOHNSON (L.-P.-V.) and OBOLENSKY (G.), 1954. — Note on the effect of ultrasonic vibrations on development of barley. *Can. Jour. of Agr. Science*, Vol. 34, N° 6, p. 651-52.
66. JOHNSON (L.-P.-V.), 1952. — *An introduction to applied biometrics* Burges Publ. Co. Mineapolis, U.S.A.
67. KAIBARA (T.), 1949. — Effects of ultra-sound on *Penicillium Javanicum*. *Jour. Agr. Sci. Jap.*, 22, 142-144.
68. KENT, JONES (D.-W.) and AMOS (A.-J.), 1940. — A new flour test : « the dextrin figures ». *Cereal Chemistry*, 17, 215-279.

69. KNAPP (W.), 1952. — Die Wirkung von Ultra-Schall auf Typhus-bakterien. *Arch. Hyg. Bakt. Bl.*, 319-342.
70. KNEEN (E.), SANDSTEDT (R.-M.) and HOLLENBECK (C.-M.), 1943. — The differential stability of the malt amylases-separation of the alpha and beta components. *Cereal Chem.* **20**, 399-423.
71. LANGEVIN (P.), 1928. — Les ondes ultrasonores. *Rev. Gén. Electricité* **23**, p. 626.
72. LANSING (A.-K.) and ROSENTHAL (T.-B.), 1952. — The reaction between Ribonucleic Acid and Ionic transport across the cell surface. *Jour. Cell. and Comp. Physiol.* **40**, 337-346.
73. LINDSTRÖM-LANG (J.) and ENGEL (C.), 1937. — Über die Verteilung der Amylase in den äusseren Schichten des Gerstenkornes. *Enzymologia*, **3**, 138-146.
74. LOISELEUR (J.), 1945. — Sur le mode d'action des Ultra-sons sur les microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, **71**, 378-380.
75. LOZA (S.), 1949. — Action des Ultra-sons sur les graines et les plantules des végétaux supérieurs. *C. R. Ac. Sci.*, **228**, 593.
76. LÜERS (H.) — 1933. — Die Entwicklung der Amylase während der Keimung der Gerste. *Wochenschr. Brauerei*, **50**, 297-300.
77. MANDELS (G.-R.), 1953. — The properties and surface location of an enzyme oxydizing ascorbic acid in fungus spores. *Arch. Biochem. Biophys.* **42**, 164-173.
78. MC QUILLLEN (K.), 1951. — The bacterial surface IV. Effect of Streptomycin on the Electrophoretic mobility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Bioch. Bioph. Acta*, **7**, 54-60.
79. MILLER (Ph.), 1754. — *The Gardner's Dictionary*, edit. 4, vol. 3, 215, London 1754. (Formation du parfum de la vanille.)
80. MÜHLETHALER (K.), 1955. — Untersuchungen über den Bau der Stärkekörner. *Zeit. für Wissensch. Microscopie ü microsc. Technik*, Band 62, Heft 6, 394-400.
81. MYRBÄCK (K.) and MYRBÄCK (S.), 1936. — Über freie und gebundene Amylase in der Gerste. *Biochem. Z.*, **265**, 282-289.
82. NEWCOMER (E.-H.) and WALLACE (R.-M.), 1949. — Chromosomal and nuclear aberrations induced by ultrasonic vibrations. *Amer. Jour. of Botany*, **36**, 230-236.
83. NIETHAMMER (A.), 1930. — Die Dosis « tolerata » und « toxica » der Beizmittel als eine Komponente der physico-chemischen Struktur des Samenkornes. *Z. Pflanzenkr. ü. Pflanzenschäd.*, **40**, 44-50.
84. OBOLENSKY (G.), 1953. — Stimulation of plant growth by ultrasonic waves. *Radio-Electronics*, (July), p. 76-80.
85. OBOLENSKY (G.), 1957. — Etude statistique des thermogrammes microcalorimétriques et de la fréquence de germination d'Orge traité aux Ultra-sons. (*En préparation.*)
86. PRAT (H.) et CALVET (E.), 1944. — Application de la microcalorimétrie à l'analyse des stades initiaux de la germination. *C. R. Soc. Biol.*, Fil. Marseille.
87. PRAT (H.) et CALVET (E.), 1945. — Sur le dégagement de chaleur manifesté au cours du premier stade de l'hydratation des graines. *C. R. Ac. Sci.* **220**, p. 117.

88. PRAT (H.) et CALVET (E.), 1945. — Influence de la déshydratation préalable des graines sur la thermogénèse de germination. *C. R. Ac. Sci.* 220, p. 206.
89. PRAT (H.), 1951. — Influence de la température ambiante sur la thermogénèse des germinations. *Rev. Can. Biol.* **10**, 443-454.
90. PREECE (J.-A.) and MACKENZIE, 1952. — Non starchy polysaccharides of cereal grains. *J. of the Inst. of Brewing*, 353-362.
91. PREECE (J.-A.) and AITKEN (R.-A.), 1953. — Non starchy polysaccharides of cereal grains. Cellulase activity and autolysis of sum malting barleys. *J. of the Inst. of Brewing*, 59, 453-462.
92. PRUDHOMME (R.-O.) et GRABAR (P.), 1949. — Dépolymérisation sous l'action des Ultra-sons. *Jour. Chimie Physique*. Vol. 46, N° 11-12, p. 667-670.
93. PRUDHOMME (R.-O.), 1950. — Sur la dépolymérisation par les Ultra-sons. *J. Chimie Physique*. Vol. 47, N° 9-10, p. 795-797.
94. REDFERN (S.), 1947. — Methods for determination of alpha-amylase. IV. A glass end point color standard for use in the dextrinizing method; effect of temperature and starch lot in this method. *Cereal chemistry*, **24**, 259-268.
95. REDFERN et al., 1949. — Alpha-amylase. *Proc. Amer. Soc. of Brewing Chem.*, 14, 165-168.
96. ROTHSTEIN (A.-A.) and LARRABEE, 1948. — The relationship of cell surface to metabolism. II. The cell surface of yeasts as the site of inhibition of glucose metabolism. *J. Cell. and Comp. Physiol.* **32**, 247-260.
97. RUBAN (E.-L.), et DOLPOPOLOV (N.-N.), 1953. — Sur l'action des ondes ultrasonores sur les premières phases du développement des plantes (en russe). *C. R. Acad. Sci. U.R.S.S.*, **84**, N° 3, 623-626.
98. RUST (H.-H.) — 1952 and 1953. — *Angewandte Chemie*, **64**, (1952), 162. *Angewandte Chemie*, **65** (1953), 249.
99. SANDERGREN (E.) and KLANG, 1950. — On barley Amylase and Proteinase. *J. Inst. of Brewing*, **56**, 313-319.
100. SANDERGREN (E.) and ENEBO (J.), 1952. — Cell wall decomposing enzymes of barley and malt. *J. Inst. of Brewing*, 58, 198.
101. SANDSTEDT (R.-M.), KNEEN (E.) and BLITH (M.-J.), 1939. — A standardized Wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. *Cereal. Chemistry*, **16**, 712-723.
102. SASAGAWA et al., 1939. — The influence of ultrasonic waves on shoot development, flowering and changes in leaf structure. *J. Med. Sci. Bioph. Japan*. Vol. 5, 139.
103. SCHMID (G.), 1940. — Zerreiben von Makromolekülen. Versuch einer Erklärung der depolymerisierenden Wirkung von Ultraschallwellen. *Phys. Z. Bd* 41, p. 325-337.
104. SCHMID (G.), 1949. — Abbau von Makromolekülen durch Ultraschall. *Der Ultraschall in der Medizin*. Kongressbericht der Erlanger Ultraschalltagung 1949.

105. SCHMIDT (W.-J.), 1924. — Die Bausteine des Tierkörpers in polarisiertem Licht. *Ber. Niederrhein. Ges. Naturkunde*, Bonn.
106. SCHMIDT (W.-J.), 1934. — Submicroscopic structure of cells and tissues. *Handbuch biol. Arbeitsmeth.* Abt V, Teil 10, 435.
107. SELMAN (R.-W.) and SUMMER (R.-J.), 1947. — The use of the amylograph for flour malt control. *Cereal Chem.* **24**, 291-299.
108. STAUDINGER (H.), 1947. — *Makromolekulare Chemie und Biologie* Basel : Wepf 1947.
109. STAUDINGER (H.) and STAUDINGER (M.), 1954. — *Die makromolekulare Chemie ü ihre Bedeutung für die Protoplasma forschung*. Wien, Springer Verlag.
110. STAUDINGER (H.), 1955. — Über die Grundlagen der makromolekularen Chemie. *Die Naturwissenschaften*, Heft 9, p. 221-30.
111. STEINBACH (H.-B.), 1951. — Permeability. *Am. Rev. Physiol.*, **8**, 21-40.
112. STONE (I.), 1952. — A sensitive method for the determination of alpha-amylase activity of flour. *Cereal Chemistry*. Vol. 29, p. 228-234.
113. STUART (H.-A.), 1953. — *Die Physik der Hochpolymeren, Bd II, Das Makromolekül in Lösungen*. Berlin, Springer Vrlg 1953.
114. SUZUKI (M.), 1939. — Einfluss der Ultraschallwellen auf Reissprossen ü Entwicklung des Sprossenteils. *Kukumin Igaku*, Bd 16, p. 142.
115. TOURNIER (P.), 1948. — *M. D. thèse*, 97 pp. Paris.
116. VIRTANEN (A.-J.), 1942. — Die Enzyme in lebenden Zellen. *Suomen Kemistilehti*, B. XV, 1942.
117. VIRTANEN (A.-J.), 1944. — Die Keimung ü Reifung der Samen als biochemisches Geschehen. *Suomen Kemistilehti*, B. 17, 21.
118. VIRTANEN (A.-J.) and WINKLER (U.), 1949. — Effect of decrease in protein content of cells on the Protheolytic enzyme System. *Acta Chem. Scandinavica*, **3**, 272-278.
119. VIRTANEN (A.-J.), 1952. — Molecular Nitrogen Fixation and Nitrogen Cycle in Nature. *Tellus*, Vol. 4, N° 4, p. 304-306.
120. VOLZ (F.-E.) and RAMSTAD (P.-E.), 1952. — Effects of various physical treatments, upon the amyloclastic susceptibility of starch. *Food Research*, Jan. Febr., Vol. 17, p. 81-92.
121. WALLACE (R.-H.), BUSHNELL (R.-J.) and NEWCOMER (E.-H.), 1948. — The induction of cytogenetic variations by ultrasonic waves. *Science*, 107, 577-578.
122. WALLACE (R.-H.), BUSCHNELL (R.-S.), 1948. — Production of phenotype and genotype variations in seedlings by ultrasonic vibrations. *Am. J. of Botany*, **35**, N° 10, 813.
123. WALDSCHMIDT-SEITZ (E.) and PURR (A.), 1930. — Über amylokinase, einem natürlichen Aktivator des Stärkeabbaues in Keimender Gerste. *Z. Physiol. Chem.*, 203, 117-131.
124. WALDSCHMIDT-SEITZ (E.), 1932. — Zur Kenntnis der Amylokinase. *Z. Physiol. Chem.* **213**, 63-70.
125. WALDSCHMIDT-SEITZ (E.) and MAYER (K.), 1935. — Über Amylophosphatase aus Gerste. *Z. Physiol. Chem.* **236**, 168-180.

126. WOOD (R.) and LOOMIS (A.-L.), 1927. — The physical and biological effects of high frequency sound waves of great intensity. *The London, Edinburgh and Dublin. Philosophical Magazine and Journal of Science*, September.
 127. WOODRUFF (S.) and MAC MASTERS (M.-M.), 1938. — Gelatinization and retrogradation changes in corn and wheat starches shown by photomicrographs. *Univ. Illinois Agr. Exp. St Bull.* 445.
 128. YAMAHA (G.) und UEDA (R.), 1939. — Über die Einfluss der Ultraschallwellen auf die Wurzelspitzenzellen von *Vicia Faba* L. *Cytologica*, Tokyo, 9, 524-529.
 129. YAMAGASHY (G.), 1952. — Enzymic studies on cereals, VII : Dextrinizing amylase of rice seeds. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **13**, 1268-1274.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION	9
1° Rappel des généralités sur les Ultra-sons	9
2° Rappel des principaux travaux, tendances et problèmes	11
CHAPITRE I. — Etude de l'accélération de la germination de l'Orge par les Ultra-sons	15
A -- <i>Objet et plan de l'étude</i>	15
B -- <i>Matériel et techniques expérimentales</i>	16
I — Echantillon des graines utilisées	16
II — Dispositif utilisé pour traiter les graines par les Ultra-sons	16
III — Contrôle de l'effet du traitement sur les graines	16
1) Aptitude des graines à absorber de l'eau	16
2) Contrôle de la croissance des plantules issues des graines traitées et non-traitées	17
3) Etude à l'aide du P_{32} , de l'accélération de la croissance et du métabolisme	18
C -- <i>Résultats expérimentaux</i>	19
I — Absorption d'eau et de colorant par les graines	19
1) Quantité d'eau absorbée par les graines	19
2) Absorption de colorant par les graines	20
II — Détermination de l'accélération de la germination à l'aide des indices de V. DURAND	21
a) Déterminations faites immédiatement après le traitement aux Ultra-sons	21
b) Déterminations faites plusieurs semaines ou plusieurs mois après le traitement	21
REMARQUE - ÉTUDE STATISTIQUE	22
III — Etude comparative des plantules issues des graines traitées et non-traitées	22
1 — Détermination de la teneur en eau des plantules	22
a) Poids frais	22
b) Poids sec et teneur en eau	22
2 — Déterminations basées sur l'utilisation de P_{32}	23
D — <i>Influence de la longueur d'onde dans l'action des Ultra-sons sur la germination des graines de céréales</i>	24
1 — Quantité d'eau absorbées par les graines d'orge ultrasonnées	24
2 — Etude comparative des plantules issues des graines ultrasonnées sous diverses fréquences	24
a) Poids frais des plantules	24
b) Méthode basée sur l'emploi de P_{32}	25
3 — Contrôle microcalorimétrique de la germination-respiration	25
DISCUSSION	26
CHAPITRE II. — Etude microcalorimétrique de l'accélération des processus métaboliques	26

I — Généralité sur la microcalorimétrie	26
II — Technique expérimentale	28
III — Résultats expérimentaux obtenus	29
IV — Interprétation des résultats	34
V — Analyse statistique des débits de chaleur produits par la germination	36
CHAPITRE III. — Action des Ultra-sons sur l'activité enzyma- tique	38
<i>Première partie : Action des Ultra-sons sur l'alpha-amylase</i>	39
1 — Généralités	39
2 — Dosage de l'alpha-amylase	40
a) Principe	40
b) Détails de la technique opératoire	41
c) Calculs	42
3 — Résultats obtenus	42
<i>Deuxième partie : Action des Ultra-sons sur la cellulase</i>	45
1 — Généralités	45
2 — Mesure de l'activité des enzymes sur un substrat syn- thétique	46
A — Modifications apportées à la méthode ENEBO	46
a) Détermination de la densité	46
b) Concentration	47
c) Viscosité absolue	47
d) Préparation de l'extrait	47
e) Détermination de l'activité	48
B — Résultats fournis par la méthode ENEBO modifiée	48
C — Observations	50
3 — Mesure de l'activité des enzymes sur un substrat naturel (β -glucosane)	52
DISCUSSION	52
CHAPITRE IV. — Etude de l'action des Ultra-sons sur le déve- loppement de la vanilline dans la préparation de la Vanille ...	54
1 — Généralités	54
2 — Technique expérimentale	55
3 — Résultats obtenus	55
4 — Interprétation des résultats	55
DISCUSSION	58
CHAPITRE V. — Discussion et conclusion générale	59
RÉSUMÉ	63

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Diverses actions des ultra-sons en biologie.

Vu et approuvé :

Paris, le 6 mars 1957.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH.

